

Aus den Medizinischen Universitätskliniken und -polikliniken Gießen

Direktoren: Professor Dr. med. H. J. Dengler
(Vorsitzender des Direktoriums)
Professor Dr. med. H. A. Kühn
Professor Dr. med. H. G. Lesch

EINFLUSS DER DURCH STREPTOKINASE INDUZIERTEN FIBRINOLYSE AUF DEN FAKTOR XIII (IN VITRO)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät
der
Justus Liebig-Universität
in
Gießen

vorgelegt von
Hans-Friedrich Spies
Lollar/Gießen

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545915_0071

Aus den Medizinischen Universitätskliniken und -polikliniken Gießen

Direktoren: Professor Dr. med. H. J. Dengler
(Vorsitzender des Direktoriums)

Professor Dr. med. H. A. Kühn

Professor Dr. med. H. G. Lasch

EINFLUSS DER DURCH STREPTOKINASE INDUZIERTEN FIBRINOLYSE AUF DEN FAKTOR XIII (IN VITRO)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Medizinischen Fakultät

der

Justus Liebig-Universität

in

Gießen

vorgelegt von

Hans-Friedrich Spies

Lollar/Gießen

1969



Dekan: Professor Dr. med. H. Rettig
Referent: Professor Dr. med. H.G. Lasch
Korreferent: Professor Dr. med. E. Habermann

Tag der mündlichen Prüfung: 4. November 1969

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
1) Die Blutgerinnung	1
a) Die Vorphase und die 1. Phase	1
b) Die 2. Phase	4
2) Einfluß der Fibrinolyse auf Fibrinogen, Fibrin und Gerinnungsfaktoren	8
3) Fragestellung	12
II. Methodik	13
1) Herstellung von FSF-freiem Humanfibrinogen durch Glycinfällung von Plasma und anschlies- sender Chromatographie mit Ionenaustauschern	13
2) Herstellung von FSF-freiem Humanfibrinogen durch Chromatographie von Cohn-Fraktion I mit Ionenaustauschern	17
3) Prüfung von Fibrinogen auf FSF-Freiheit	17
4) Quantitative FSF-Bestimmung	18
5) Fibrinogenbestimmung	20
6) Bestimmung der Thrombingerinnungszeit	21
7) Faktor V Bestimmung	22
8) Faktor VIII Bestimmung	22
9) Methode zur Untersuchung des Fibrinolyseein- flusses auf den Faktor XIII	23

III. Ergebnisse

26

- 1) Einflüsse des Testsystems zur Untersuchung des Fibrinolyseeinflusses auf die Methode der FSF-Bestimmung 26
 - a) Einflüsse der Verdünnungsmittel des zu untersuchenden Plasmas 26
 - b) Einfluß der Streptokinase auf die Löslichkeit der Gerinnsel im FSF-Test 27
 - c) Einflüsse der Antifibrinolytica 28
 - α) Trasylo1 28
 - β) AMCHA 32
- 2) Einfluß von veränderten Testfibrinogenkonzentrationen auf die Faktor XIII Werte im FSF-Test 37
- 3) Einfluß der Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit 39
 - a) Untersuchungen mit gelagertem Humanplasma 39
 - b) Untersuchungen mit frischem Humanplasma 42
 - c) Untersuchungen mit Hämophilie-A-Plasma 49
- 4) Einfluß der Fibrinogenspaltprodukte auf die Thrombingerinnungszeit des Testfibrinogens 52
- 5) Einfluß der Streptokinase-induzierten Fibrinolyse auf die Faktoren VIII und V 53
 - a) Verhalten des Faktor VIII 53
 - b) Verhalten des Faktor V 55
- 6) Einfluß von Thrombinspuren auf die Faktor XIII Aktivität im Plasma 55

	Seite
IV. Diskussion	58
1) Spezifität des verwendeten FSF-Testes	58
2) Einfluß der Streptokinase auf das Testsystem	59
3) Einfluß der Antifibrinolytica auf den Faktor XIII und die Gerinnungsfähigkeit des Testfibrinogens	60
a) AMCHA	60
b) Trasylol	62
4) Einfluß der Fibrinogenspaltprodukte auf den Faktor XIII und die Fibrinpolymerisation	62
5) Direkter Einfluß der Streptokinase-induzierten Fibrinolyse auf die Aktivität des Faktor XIII	63
6) Verhalten der Faktoren VIII und V bei Streptokinase induzierter Fibrinolyse	64
7) Thrombinentstehung durch die Fibrinolyse	66
8) Unabhängiges Verhalten des FSF vom Fibrinogen unter der Fibrinolyse	71
V. Zusammenfassung	73
VI. Literaturverzeichnis	75

I. EINLEITUNG

1) Die Blutgerinnung

Der Ablauf der Blutgerinnung wird auf die herkömmliche Art in fünf verschiedene Phasen eingeteilt. Als Vorphase bezeichnet man die Thrombokinasebildung, als 1. Phase die Umwandlung des Prothrombin zu Thrombin, als 2. Phase die Umwandlung des Fibrinogen zu Fibrin; danach folgt als 3. Phase die Retraktion (20).

a) Die Vorphase und die 1. Phase

Die Thrombinbildung kann grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen zustande kommen. Einmal über das sogenannte Extrinsic System, das durch eine Gewebsverletzung aktiviert wird, zum anderen durch das Intrinsic System, dessen Aktivierung über einen Oberflächenkontakt ausgelöst wird.

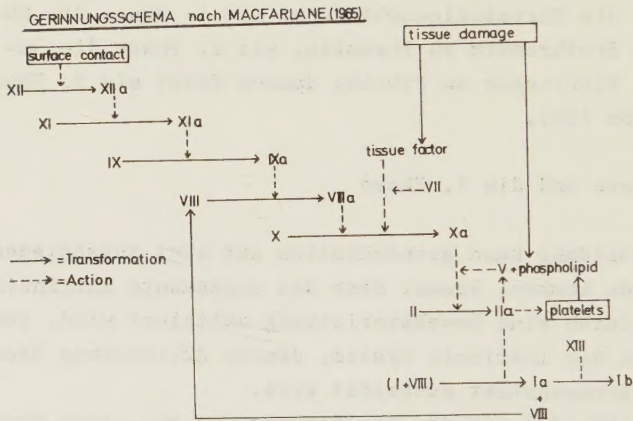
Nach MACFARLANE (70) ist für die Wirkung der bei einer Gewebsverletzung frei gewordenen Gewebsthrombokinasen - also einer Aktivierung des Extrinsic System - der Faktor VII als Accelerator notwendig.

Zum Aktivierungsablauf des Intrinsic System gehören demgegenüber mehrere Faktoren, die alle als Enzyme in einer inaktiven Vorstufe im Plasma vorliegen und sich kaskadenförmig gegenseitig aktivieren (s. Abb. 1).

Sowohl das Extrinsic System, als auch das Intrinsic System führen zu einer Aktivierung des Faktor X, der auch als Blutthrombokinasen bezeichnet wird.

Erst der aktivierte Faktor X ist mit Hilfe des Faktor V, der wie der Faktor VII als Accelerator auftritt, in der Lage Prothrombin in Thrombin umzuwandeln.

Im Gegensatz zu MACFARLANE stellt SEEGER (92) die zentrale Rolle des Prothrombin im Ablauf der Gerinnung in den Vorder-



PROTHROMBIN - AKTIVIERUNG nach SEEGERs

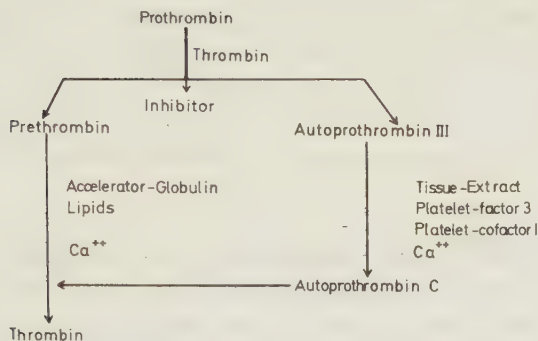


Abb. 2: Prothrombin - Aktivierung nach SEEGERs

Internationale Nomenklatur

Nomenklatur nach SEEGERs

Faktor II	Prothrombin
Faktor X inaktiv	Autoprothrombin III
Faktor X aktiv	Autoprothrombin C
Faktor VII	Autoprothrombin I
Faktor IX	Autoprothrombin II
Faktor VIII	Plättchencofaktor I
Faktor V	Accelerator Globulin

Auch die Faktoren VII und IX werden von SEEGERs als Prothrombin-derivate angesehen, da hochgereinigte Prothrombinpräparationen einen Mangel dieser Faktoren beseitigen können (92, 96, 97).

b) Die 2. Phase

Die 2. Phase der Gerinnung, die Umwandlung des Fibrinogen zum Fibrin, wurde lange Zeit als eine ausschließliche Reaktion zwischen Thrombin und Fibrinogen angesehen. Thrombin ist ein proteolytisches Enzym, mit sehr hoher Spezifität für die Reaktion mit Fibrinogen (53). Thrombin spaltet vom Fibrinogenmolekül zwischen den Aminosäuren Arginin und Glycin die Fibrinopeptide ab (53, 63). Die dabei entstehenden Fibrinmoleküle aggregieren danach spontan und bilden ein gelartiges Gerinnsel (53).

Über die physikalischen Eigenschaften des Gerinnsels hat schon HEKMA (1914) Untersuchungen durchgeführt. Als Nebebefund stellte er fest, daß ein mit Hilfe von Serum entstandenes Gerinnsel sich nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C in einer 0.02 % NaOH vollständig löste, während ein auf die gleiche Art entstandenes Gerinnsel, 18 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, nicht mehr gelöst werden konnte (37).

1923 konnten BARKAN und GASPAR und 1944 ROBBINS den gerinnselstabilisierenden Effekt des Serums ebenfalls nachweisen (8, 89). Die bis zu diesem Zeitpunkt erhobenen Befunde wurden weniger unter dem Gesichtspunkt der Fibrinstabilisierung erhoben und waren bei den angegebenen Untersuchungen mehr oder weniger Nebebefunde.

Erst 1948 erhoben LAKI und LORAND die Forderung, daß es zwei verschiedene Arten von Fibringerinnseln gibt, die sich durch ihre Löslichkeit in Harnstoff- und Monochloressigsäurelösungen unterscheiden. Sie machten für das Auftreten von Harnstoff und MCES (Monochloressigsäure) unlöslichem Fibringerinnseln einen Faktor verantwortlich, den sie Fibrinstabilisierenden Faktor (FSF) nannten, und der das durch Thrombin entstandene Fibrin monomer in unlösliches Fibrin polymer umwandelt (54).

DUCKERT konnte 1960 von einer hämorrhagischen Diathese berichten, die nachweislich durch mangelhaft stabilisierte Gerinnsel zustande kam. Die von Patientenplasma entstandenen Gerinnsel waren vollständig in Harnstoff aufzulösen, wodurch der FSF auch klinische Bedeutung gewann, und seitdem gemäß der Richtlinien des Internationalen Nomenklaturkommittees als Faktor XIII bezeichnet wird (22, 99). Inzwischen wurde auch noch von anderen Autoren von einem congenitalen FSF-Mangel berichtet (6, 38, 103).

Die Wirkung des fibrinstabilisierenden Faktors, der vorwiegend im Plasma vorkommt und auch schon aus Thrombocyten isoliert wurde (13, 46, 69), wurde erst in den letzten Jahren aufgeklärt.

Zuerst wurde festgestellt, daß Cystein und andere Sulfhydrylgruppen enthaltende Substanzen eine Potenzierung der Polymerisationswirkung des Faktor XIII verursachen. LOEWY und EDSALL nahmen deshalb an, daß die Gerinnselpolymerisation durch das Auftreten von Disulfidbindungen zwischen den einzelnen Fibrinmolekülen zustande kommt (61).

Diese Cysteinwirkung wurde auch von LORAND und JACOBSON bestätigt. Sie glaubten, daß der FSF bei der Polymerisation in Form einer stöchiometrischen Reaktion beteiligt sei. Die Untersuchungen wurden aber mit einem durch FSF verunreinigten Fibrinogen durchgeführt, da Zusatz von Cystein ein aus dem Testfibrinogen entstandenes Gerinnsel voll stabilisiert und unlöslich gemacht hatte (65).

Nach BULUK, LOEWY und LORAND liegt der Faktor XIII im Plasma in einer inaktiven Vorstufe vor und für seine Aktivierung sind Thrombin und Calcium nötig (13, 60, 64). Durch die ausgedehnten Untersuchungen von LOEWY et al. konnte nachgewiesen werden, daß der Faktor XIII ein Enzym ist, das ein Molekulargewicht von 350.000 hat. Das Molekül zerfällt in gereinigtem Zustand

in drei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 110.000 und ist dann nicht mehr zu aktivieren. Diesen schnellen Zerfall des gereinigten FSF kann man durch Zusatz von Cystein entscheidend verlangsamen. Die Untersuchungen von LOEWY wurden mit hochgereinigtem Fibrinogen durchgeführt, das nach seinen Angaben trotz Zusatz von Cystein - durch Thrombin und Calcium zur Gerinnung gebracht - nach 18 Std. Inkubation bei 37°C noch ein lösliches Gerinnsel ergeben hat (59, 60).

Über den Wirkungsmechanismus des Enzyms bestanden jedoch unterschiedliche Anschauungen. Nach LOEWY verändert der Faktor XIII Fibrinmonomer so, daß Disulfidbrücken entstehen können (62). LAKE hielt demgegenüber den FSF für ein oligosaccharidspaltendes Enzym (52). LORAND nahm an, daß der FSF eine Transpeptidase sei, wies aber darauf hin, daß die Möglichkeit einer Transamidasereaktion nicht ausgeschlossen sei (68). Dieser Hinweis wurde dann von LOEWY und CHANDRASEKHAR 1964 bestätigt, indem beide eine Ammoniakfreisetzung nachweisen konnten (15, 58).

Nach all diesen Untersuchungen führt also Thrombin in Gegenwart von Calcium zu einer Aktivierung der FSF (67). Für diese Aktivierung sind SH-Gruppen nötig (58). Nach BULUK treten gleichzeitig bei der FSF-Aktivierung freie SH-Gruppen auf (14). SH-Gruppenhemmer verursachen also keine Hemmung der Faktor XIII Wirkung, sondern eine Inhibition seiner Aktivierung. Der aktivierte Faktor XIII führt dann zu einer Reaktion zwischen Lysin und Glutamin im Fibrinmonomer und damit zur Polymerisation. Dabei entsteht unter dem Einfluß von FSF eine Glutamyl- ϵ -Aminolysin-Bindung unter Freisetzung von Ammoniak. LOEWY konnte mit Hilfe von FSF Lysin an Fibrin und auch an Casein binden. Der Fibrinstabilisierende Faktor ist also ein Enzym vom Typ der Transamidase (57, 58). Diese Auffassung wurde noch dadurch bestätigt, daß GEE (Glycinäthylester) durch den FSF an das monomere Fibrin gebunden werden kann, so daß die

Polymerisation ausbleibt (57). GEE ist also als spezifische Hemmsubstanz für den Faktor XIII aufzufassen (25, 66). Nach der Aktivierung des Faktor XIII ist Thrombin selbst für die Polymerisation nicht mehr notwendig (67). Ebenso wie BULUK (13) konnten auch LORAND und KONISHI zeigen, daß der Faktor XIII nach seiner Aktivierung schnell an Aktivität verliert, aktivierter FSF also sehr instabil ist (67). Nach diesen Untersuchungen ergibt sich für den FSF folgendes Aktivierungsschema (Abb. 3).

Aktivierung und Wirkung des FSF

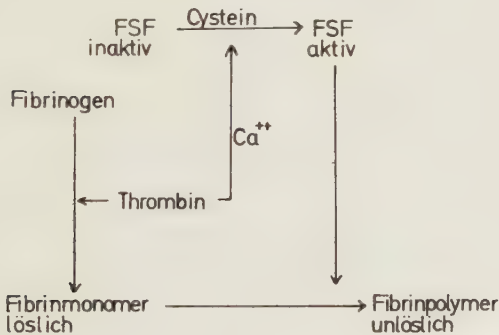


Abb. 3: Aktivierung und Wirkung des FSF

2) Einfluß der Fibrinolyse auf Fibrinogen, Fibrin und Gerinnungsfaktoren

Fibrinogen stellt nicht nur für Thrombin das adaequate Substrat dar. Auch Plasmin ist in der Lage mit Fibrinogen, aber auch mit Fibrin zu reagieren (Abb. 4).

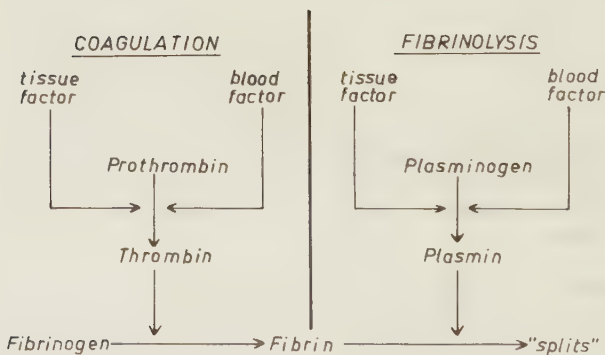


Abb. 4: (nach KOLLER (48))

Thrombin und Plasmin, zwei proteolytische Enzyme aus zwei antagonistischen Systemen, wirken aber auch zudem auf die gleichen Gerinnungsfaktoren ein.

Sowohl der Faktor V, als auch der Faktor VIII werden von Plasmin im Laufe einer Fibrinolyse in ihrer Aktivität reduziert (5, 17, 21, 28, 29, 41, 55), zwei Faktoren, die in ihrem Aktivierungs-

modus an das Vorhandensein von Thrombin gebunden sind (84, 87, 98). Von den anderen Faktoren bleiben VII, IX und X konstant unter Plasmineinfluß. Der Faktor II fällt nur unwesentlich ab (42). Im gereinigten Zustand ist Prothrombin aber voll zu proteolysieren (94). Faktor V und Faktor VIII stehen außerdem in einem engen Zusammenhang mit Fibrinogen, was sich in der schwierigen Herstellung von fibrinogenfreien Präparationen dieser Faktoren zeigt.

Der Faktor XIII verhält sich ähnlich. Auch er ist ein thrombinaktivierbarer Faktor, der sich mit biochemischen Methoden sehr schwer vom Fibrinogen trennen läßt. Sein Molekulargewicht und sein molekularer Aufbau scheinen dem des Fibrinogens recht ähnlich zu sein. Daß über Sephadex eine Trennung von Fibrinogen und FSF nicht möglich ist, zeigt ebenfalls die Ähnlichkeit der Molekulargewichte (47). Im normalen Plasma scheint der Faktor XIII mit dem Fibrinogen im Komplex gebunden zu sein. Erst durch eine Chromatographie mit DEAE-Zellulose sind die beiden Faktoren I und XIII zu trennen.

Während über die Beziehungen der Faktoren V, VIII und XIII zu Thrombin und Fibrinogen einiges bekannt ist, gibt es über den direkten Einfluß der Fibrinolyse auf diese Faktoren nur über die Faktoren V und VIII genauere Untersuchungen. Über die Beziehung FSF zur Fibrinolyse gibt es nur wenige Hinweise. DUCKERT und SIGG haben 1963 angegeben, daß bei einer therapeutischen Fibrinolyse ein vollkommenes Verschwinden des FSF - gemessen mit der Methode nach SIGG (100, 101) - zu beobachten ist (23).

Die Fibrinolyse führt aber nicht nur zu einer Inaktivierung der angegebenen Faktoren V und VIII. Von JUNG und DUCKERT wurde zu Beginn der Fibrinolyse eine deutliche Aktivierung der beiden Faktoren festgestellt. Erst nach dieser kurzen Aktivierungsphase kommt es zu dem schon beschriebenen Aktivitätsverlust (41). Dieses merkwürdige Phänomen der Hyperkoagulabilität zu

Beginn der Fibrinolyse konnten auch BELLER und GLAS über die Abnahme der Recalcifizierungszeit des Plasmas und einer Aktivitätszunahme des Faktor V bestätigen (10). AMRIS setzte Plasma so niedrige Plasminkonzentrationen zu, daß noch keine nachweisbare Fibrinogenolyse auftrat, und konnte neben der Abnahme der Recalcifizierungszeit von 151 sec auf 106 sec, eine deutliche Aktivitätserhöhung der Faktoren V und VIII bei gleichzeitiger Abnahme der Thrombinbildungszeit bestimmen (4, 5). Ähnliche Untersuchungen über den fibrinstabilisierenden Faktor könnten also eventuell einen Hinweis dafür bringen, inwieweit man den Faktor XIII in die Reihe der fibrinogen-ähnlichen Faktoren einordnen kann.

Aber nicht nur der direkte Einfluß des Plasmins auf den Faktor XIII ist von Interesse. Auch die bei der Fibrinogenolyse entstehenden Fibrinospaltprodukte, einfach "splits" genannt, greifen in den Wirkungsmechanismus des FSF ein. NIEWAROWSKY und KOWALSKI (83) haben die durch die Fibrinogenspaltprodukte hervorgerufene Polymerisationsstörung beschrieben und die "splits" als Antithrombin VI bezeichnet, da sie eine Verlängerung der Thrombinzeit verursachen.

Die Thrombinzeitverlängerung ist nicht nur im lysierten Plasma nachweisbar, auch Zusatz von "splits" zu Normalplasma führt zu einer Verlängerung, die auch bei hohen Thrombinkonzentrationen nicht zu beseitigen ist (28).

Nach FLETCHER, ALKJAERSIG und SHERRY können die "splits" sowohl durch die Einwirkung von Plasmin, als auch durch Trypsin, ebenso durch die Proteolyse sowohl von Fibrin, als auch von Fibrinogen entstehen (28). Lysiert man gereinigtes Fibrinogen vollkommen, so erkennt man, daß drei verschiedene Arten von Spaltprodukten, abzutrennen durch ihr Molekulargewicht, entstanden sind. Neben der ersten, sehr undifferenzierten, niedermolekularen Gruppe, neben einer zweiten einheitlicheren Gruppe von splits mit einem Molekulargewicht von etwa 30.000, findet man

die hochmolekularen Spaltprodukte mit einem Molekulargewicht von 80.000, die über die Hälfte der entstandenen "splits" ausmachen. Die letzte hochmolekulare Gruppe ist für die auftretende Thrombinzeitverlängerung verantwortlich (27).

Die "splits" scheinen also nach der Thrombinzeit zu urteilen, einen hemmenden Effekt auf Thrombin auszuüben, etwa wie KOPEC, KOWALSKI und STACHURSKA vermuten, durch Hemmung der Proteaseaktivität des Thrombins (49).

Jedoch besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen der Thrombinzeitverlängerung von BAME (Benzoylargininmethylester), einem spezifischen Thrombininhibitor und derjenigen, hervorgerufen durch Zusatz von Fibrinsspaltprodukten. Die Thrombinzeitverlängerung durch BAME ist durch eine Konzentrationserhöhung von Thrombin zu beseitigen, die durch splits nicht (28). Außerdem haben die "splits" auf die spezifische Thrombinwirkung auf BAME keinen Einfluß (3).

Die Verlängerung der Thrombinzeit ist also nicht durch einen "Antithrombineffekt" der "splits" im engeren Sinne zu erklären. Thrombin baut die Spaltprodukte sogar in das monomere Gerinnsel ein (3), und es kommt erst dann in der Polymerisationsphase zu einer Beeinflussung der Fibrinogen-Fibrin-Umsetzung durch die "splits". Sie verursachen also eine Polymerisationsstörung, wie auch BANG elektronenmikroskopisch zeigen konnte (8). Die Fibrinogenspaltprodukte werden also zu einem großen Teil durch Thrombin in das Fibrin monomer eingebaut. Dieses fehlerhafte Monomer ist aber nicht mehr in der Lage regelrecht zu polymerisieren. Die Thrombinzeitverlängerung durch die "splits" ist nicht durch eine echte Antithrombinwirkung zu erklären. Es handelt sich demgemäß um eine Antipolymerisationswirkung. Die Frage ist in diesem Zusammenhang naheliegend, wie sich der FSF diesen defekten Monomergerinnsel gegenüber verhält.

3) Fragestellung

Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen ergeben sich zwei verschiedene Gesichtspunkte für Untersuchungen über den Fibrinolyseeinfluß auf den Faktor XIII.

Einmal ist der direkte Einfluß der Fibrinolyse und des Plasmins auf den Faktor XIII zu prüfen, woran man einen Vergleich mit dem Verhalten der anderen fibrinogenähnlichen Faktoren V und VIII anschließen kann.

Zum anderen muß festgestellt werden, wie sich der Faktor XIII gegenüber den durch den Einbau von hochmolekularen Fibrinogenspaltprodukten veränderten monomeren Gerinnseln verhält.

II. METHODIK

1) Herstellung von FSF-freiem Humanfibrinogen durch Glycinfällung von Plasma und anschließender Chromatographie mit Ionenaustauschern

(nach KAZAL, MILLER, AMSEL, TOCANTINS (45))

Reagenzien

- (1) NH_3 -freies Glycin 165 g/l Plasma
- (2) BaSO_4 90 g/l Plasma
- (3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Bittersalz) 5 g/l Plasma
- (4) DEAE-Zellulose
- (5) Ausgangspuffer:
0.039 m Trisaminomethanolösung, mit 0.005 m Phosphorsäure auf einen pH von 8.6 titriert.
- (6) Endpuffer:
0.5 m Trisaminomethanolösung, mit 0.5 m Phosphorsäure auf einen pH von 4.1 titriert
- (7) Polyäthylenglycol
- (8) physiologische Kochsalzlösung
- (9) 0.055 molare Natriumcitratlösung, pH 7.4
- (10) 10 Einheiten Testthrombin pro ml m/40 CaCl_2 -Lösung

Die Methode der Glycinfällung und anschließender DEAE-Zellulose-Chromatographie von Humanplasma ist eine Methode, die hochgereinigtes Fibrinogen liefert, das FSF-frei und deshalb für die Faktor XIII-Bestimmungen geeignet ist. Zuerst wird Humancitratplasma bei 4°C eine Stunde lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um es thrombocytenarm zu machen.

Pro Liter zentrifugiertem Plasma werden 5 g MgSO_4 hinzugegeben, 15 min umgerührt, damit das Bittersalz in Lösung gehen kann. Danach werden 90 g BaSO_4 pro Liter Plasma zugesetzt und bei Zimmertemperatur 30 min umgerührt. Die Suspension wird dann

bei 3000 Umdrehungen pro Minute 15 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wird nochmals mit dem gleichen Verfahren behandelt. Die BaSO_4 -Adsorption dient der Entfernung von Prothrombin aus dem Plasma. Das vorher zugesetzte MgSO_4 verhindert, daß lösliche Bariumverbindungen entstehen.

Zu dem adsorbierten Plasma gibt man 165 g Glycin pro Liter. Als Bezugsmenge darf nicht die ursprüngliche Menge des Plasmas benutzt werden, sondern die Menge des Plasmaüberstandes nach der Bariumsulfatadsorption. Das Glycin muß langsam bei Zimmertemperatur in das Plasma hineingeschüttet werden. Die Fällung wird danach 30 min umgerührt und bei 11.000 Umdrehungen pro Minute 1/2 Stunde lang abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das Sediment in 0.055 m Natriumcitratlösung aufgelöst, deren Menge der des Überstandes nach der Bariumsulfatadsorption entspricht. Nachdem sich das Präzipitat gelöst hat, wird kurz bei 3000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert, um unlösliche Reste zu entfernen.

Der klare Überstand wird erneut mit 165 g Glycin pro Liter gefällt, 30 min umrühren lassen und bei 11.000 Umdrehungen pro Minute 30 min lang abzentrifugiert. Das Präzipitat wird in Ausgangspuffer aufgelöst, dessen Menge 1/5 - 1/10 des Bariumsulfatüberstandes ausmachen soll, dann kurz und scharf abzentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wird 24 Std. gegen Ausgangspuffer dialysiert, um Glycin und Citrat aus der Lösung zu beseitigen(54).

Die Glycinfällung an sich ergibt schon ein hochgereinigtes Fibrinogen, das aber noch FSF-haltig ist. Man erhält eine Lösung von etwa 95 % gerinnbarem Protein bei einer Ausbeute von etwa 60 % der Ausgangsmenge des Fibrinogen, die im Plasma vorhanden war.

Die Fibrinogenlösung wird dann nach der Dialyse noch einmal abzentrifugiert, damit keine ungelösten Bestandteile zur Chromatographie benutzt werden, da ungelöste Reste nicht an DEAE-Zellulose adsorbiert werden können. Zur Chromatographie benutzt man eine Fibrinogenlösung, die etwa eine Konzentration von 4 g% Protein hat.

20 - 30 g DEAE-Zellulose, frisch oder regeneriert, werden dreimal mit jeweils 1 l Ausgangspuffer equilibriert, sedimentieren lassen und darauf die Säule gegossen. Wenn sich die Zellulose kompakt zur Säule abgesetzt hat, werden etwa 50 ml Fibrinogenlösung vorsichtig auf die Säule gegeben und langsam eindiffundieren lassen, so daß etwa 2 g Protein aufzutrennen sind.

45 min lang wird Ausgangspuffer über die Säule gepumpt, damit die Proteine voll an DEAE-Zellulose adsorbiert werden können. Danach wird ein Puffergradient über die Säule gepumpt, der etwa 1 Liter Gesamtvolumen hat. Ausgangs- und Endpuffer werden in zwei verschieden geformte Gefäße geschüttet, die durch einen Heber miteinander verbunden werden. Der Ausgangspuffer wird in einen Rundkolben, der Endpuffer in einen Erlenmeyerkolben gefüllt. Vom Ausgangspuffer wird über die Säule abgepumpt, so daß vom Erlenmeyerkolben Endpuffer in den Ausgangspuffer überfließt. Durch die beiden verschieden geformten Gefäße steigt die Ionenstärke nicht linear, sondern zu Beginn des Gradienten langsamer, gegen Ende stärker an. Nach der Trennung der Proteine werden die Proteinkonzentrationen in einem Uvicord bei 280 mμ bestimmt, von einem Schreiber aufgezeichnet, und die aufgetrennte Lösung in verschiedenen Röhrchen von einem Fraktionskollektor aufgefangen (Abb. 5).

Proben aus den Röhrchen werden mit Thrombin-Calcium-Lösung versetzt, um festzustellen, in welcher Fraktion sich das gerinnbare Protein befindet. Die Röhrchen der Fibrinogenfraktion werden zusammengeschüttet, und über 16 Std. gegen 5 Liter physiologische Kochsalzlösung, der 250 g Polyäthylenglycol zugesetzt sind, dialysiert. Das Polyäthylenglycol bewirkt, daß

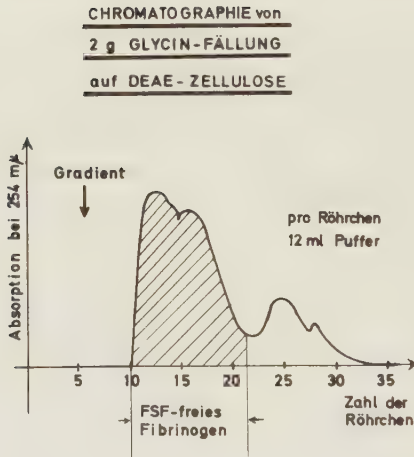


Abb. 5: Chromatographie von 2 g Glycinfällung
auf DEAE-Zellulose

die Lösung auf etwa 1/3 ihrer Ausgangsmenge konzentriert wird, so daß eine Fällung mit Ammoniumsulfat entfällt.

Nach der Dialyse wird die Lösung scharf abzentrifugiert, die Protein- und Fibrinogenkonzentration mittels der Tyrosinmethode bestimmt, und eine Probe auf FSF-Freiheit geprüft. Die fertige Fibrinogenlösung kann dann in kleinen Proben eingefroren werden. Als Endprodukt erhält man eine Lösung mit über 90 % gerinnbarem Protein, die etwa 20 - 25 % des im Plasma vor-

handenen Fibrinogens enthält.

Das Verfahren nimmt sehr viel Zeit in Anspruch. Allein die Glycinfällung dauert etwa 6 Std, wobei man das Verfahren aber gut unterteilen kann, indem man größere Mengen Plasma nur mit BaSO_4 adsorbiert, einfriert und bei Bedarf entsprechende Mengen mit Glycin fällt. Auch für das Chromatographieren benötigt man bis zu 8 Std, da der Puffer nicht zu schnell über die Säule gepumpt werden darf, damit eine bessere Trennung der Fraktionen erreicht wird.

Die Methode hat trotz des Zeitaufwandes wesentliche Vorteile: Abgesehen vom Dialysieren lassen sich alle verschiedenen Aufarbeitungsverfahren bei Zimmertemperatur durchführen. Das Verfahren enthält auch nur eine einzige Fällungsmethode, die sehr einfach zu handhaben ist, da das Glycin kristallin zugesetzt wird. Durch die geringe Anzahl von Proteinfällungen ergibt diese Methode der Fibrinogenherstellung eine recht hohe Ausbeute von hochgereinigtem FSF-freiem Fibrinogen.

2) Herstellung von FSF-freiem Humanfibrinogen durch Chromatographie von Cohn-Fraktion I auf DEAE-Zellulose

(nach FINNLAYSON u. MOSESSON (81))

3) Prüfung von Fibrinogen auf FSF-Freiheit

Reagenzien

- 1) Physiologische Kochsalzlösung
(gepuffert auf pH 7.4 durch Imidazolpuffer)
- 2) Imidazolpuffer (17.5 g/l n/10 HCl, mit 10 % NaOH auf pH 7.4 eingestellt)
- 3) 0.05 m Cystein-Lösung

- 4) Thrombin-Calcium-Lsg. (Test-Thrombin Behring)
10 E/ml m/40 CaCl_2 -Lsg.
- 5) 1.9 % Monochloressigsäure-Lösung (MCES)

Methode

Der Fibrinogengehalt der nach der Dialyse erhaltenen Lösung wird bestimmt und die Lösung mit Hilfe von physiologischer Kochsalzlösung auf 0.5 g% Fibrinogenkonzentration verdünnt und in folgendem Ansatz auf FSF-Freiheit geprüft.

- 0.4 ml phys. NaCl-Lösung
- 0.2 ml zu testende Fibrinogenlösung
- 0.2 ml frisch angesetzte Cystein-Lösung

Dieser Ansatz wird mit 0.2 ml Thrombin-Calcium-Lösung zur Gerinnung gebracht und 18 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird das Gerinnsel mit 2 ml Monochloressigsäure ausgeschüttelt. Löst sich das Gerinnsel innerhalb von 60 sec., ist das hergestellte Fibrinogen als Substrat für den FSF-Test verwendbar.

4) Quantitative FSF-Bestimmung (nach HEENE (36))

Reagenzien

- 1) siehe Prüfung auf FSF-Freiheit
- 2) 0.25 g% Fbg-Lösung (FSF-frei)

Methode

Um den Gehalt an Faktor XIII eines Plasmas zu bestimmen, wird die größte Plasmaverdünnung angegeben, die ausreichend ist, um ein in seiner Zusammensetzung definiertes Gerinnsel so zu stabilisieren, daß es nach einer einstündigen Inkubation bei

37°C im Wasserbad mit MCES nicht innerhalb einer Minute lösbar ist.

Es wurde die Methode nach HEENE benutzt, die nur durch eine geringere Fibrinogenkonzentration modifiziert wurde. Für jede hergestellte Plasmaverdünnung wird folgender Ansatz vorbereitet.

0.2 ml phys. NaCl-Lösung
0.2 ml Cystein-Lösung (frisch angesetzt)
0.2 ml 0.25 g% Fbg.Lösung (FSF-frei)
0.2 ml der jeweiligen Plasmaverdünnung

Beim Leerwert wird für die Plasmaverdünnung physiologische Kochsalzlösung zugesetzt. Die Ansätze werden gut durchgemischt und mit 0.2 ml Thrombin-Calcium-Lösung zur Gerinnung gebracht. Die Röhrchen werden 1 Std. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wird das Gerinnsel von der Wand durch leichtes Schütteln gelöst, 2 ml MCES zugesetzt, und das Gerinnsel so geschüttelt, daß es beständig von Lösungsmittel umspült ist. Man ermittelt die Lösungszeit.

Beispiel

1 : 1400 in 25 sec. löslich
1 : 1300 in 40 sec. löslich
1 : 1200 in 73 sec. löslich
1 : 1100 unlöslich
Leerwert in 19 sec. löslich

Die Plasmaverdünnung 1 : 1200 ist die höchste, bei der das Gerinnsel sich nicht mehr in 60 sec. löst. Das Plasma hat also einen Faktor XIII von 1200 E.

5) Fibrinogenbestimmung (nach RATNOFF u. MENZIE (88))

Reagenzien

- 1) CaCl_2 -Lösung, m/40
- 2) 20 E Thrombin/ml physiologische NaCl-Lösung
- 3) 20 % Na_2CO_3 -Lösung
- 4) 10 % NaOH-Lösung
- 5) Folin's-Reagenz
- 6) Physiologische Kochsalzlösung
- 7) aqua dest.

Methode

Das Fibrinogen wird mit folgendem Ansatz zur Gerinnung gebracht.

- 8.5 ml phys. NaCl-Lösung
- 0.5 ml Plasma oder Fibrinogenlösung
- 0.5 ml CaCl_2 -Lösung, m/40
- 0.5 ml Thrombinlösung 20 E/ml

Das entstehende Gerinnsel wird 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wird es mit Hilfe eines Glasstabes, dessen Ende mit Ätztinte aufgeraut ist, aus dem Röhrchen gedreht, an der Röhrchenwand ausgedrückt, und mit Filterpapier vorsichtig und vollständig vom Glasstab abgerollt.

Das Gerinnsel wird mehrmals zuerst in phys. NaCl, dann in aqua dest. durch Umschütteln gewaschen, dann in 1 ml 10 % NaOH-Lösung gebracht und 20 min im Wasserbad kochen lassen.

Als Leerwert dient ein Röhrchen mit 1 ml NaOH, das ebenfalls 20 min kochen muß.

Der Eiweißgehalt wird mit der Tyrosin-Methode bestimmt.

Nachdem sich die Röhrchen nach dem Kochen abgekühlt haben, werden pro Ansatz, einschließlich dem Leerwert

7 ml aqua dest.

3 ml Na_2CO_3 -Lösung

1 ml Folins-Reagenz

zugesezt und 15 min abgewartet, da es zur vollen Farbewicklung kommt.

Danach wird im Photometer Bausch & Lomb bei 560 mn die Farbintensität gegen den Leerwert gemessen und der Fibrinogengehalt auf der vorher bestimmten Eichkurve abgelesen.

Um den Proteingehalt einer Lösung zu bestimmen, muß man zu 1 ml NaOH 0.1 ml der zu untersuchenden Lösung geben, 20 min kochenlassen und auf die gleiche Weise weiterbehandeln wie die Fibrinogenbestimmungen.

6) Bestimmung der Thrombingerinnungszeit
modifiziert nach JÜRGENS (42))

Reagenzien

1) Test-Thrombin Behring 6 E/ml aqua dest.

Methode

0.2 ml des Streptokinaseansatzes oder mit phys. NaCl-Lösung 1 : 2 verdünntes Plasma werden etwa 20 sec. bei 37 C im Wasserbad inkubiert.

Nach Zusatz von 0.1 ml einer frisch angesetzten Thrombin-Lösung (6 E/ml aqua dest.) wird die Gerinnungszeit bestimmt.

7) Faktor-V-Bestimmung (modifiziert nach SCHULTZE u.
SCHWICK (90))

Reagenzien

- 1) Faktor-V-Reagenz Behring, gelöst in 1 ml aqua dest.
- 2) Barbituratpuffer Behring
- 3) CaCl_2 -Lösung, m/40

Ansatz

0.2 ml 1 : 20 mit Barbituratpuffer verdünntes Plasma oder
1 : 10 verdünnter Streptaseansatz und
0.2 ml Faktor-V-Reagenz
werden 30 sec. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wird
nach Zusatz von 0.1 ml Calciumchloridlösung die Gerinnungs-
zeit bestimmt, und die Faktor-V-Aktivität auf einer durch ent-
sprechende Plasmaverdünnungen von Normalpatienten ermittelten
Eichkurve abgelesen.

8) Faktor-VIII-Bestimmung (nach HARDISTY u. McPHERSON (33))

Reagenzien

- 1) Hämophilie-A-Plasma als Mangelplasma
- 2) Partielles Thromboplastin Behring PT;
1 Kapsel wird in 6 ml phys. NaCl-Lösung suspendiert
- 3) Calciumchloridlösung, m/40
- 4) Barbituratpuffer Behring

Methode

0.1 ml Hämophilie-A-Plasma, 1 : 2 verdünnt mit Barbituratpuffer
0.1 ml Partielles Thromboplastin Behring
0.1 ml der zu untersuchenden Plasmaverdünnung, mit phys. NaCl
1 : 5 verdünnt

werden 2 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, die Gerinnungszeit nach Zusatz von 0.1 ml Calciumchloridlösung bestimmt.

Die Faktor-VIII-Aktivität kann auf einer durch Untersuchung von verschiedenen Plasmaverdünnungen mehrerer Normalpatienten erhaltenen Eichkurve abgelesen werden.

9) Methode zur Untersuchung des Fibrinolyseeinflusses auf den Faktor XIII

Reagenzien

- 1) Streptokinase (Streptase Behring) 5000 i.E.
- 2) Trasylol Bayer 5000 E/ml
- 3) Reagenzien der FSF-Bestimmung
- 4) Reagenzien der Fibrinogenbestimmung
- 5) Reagenzien der Bestimmung der Thrombingerinnungszeit

Methode

Venenblut wird zu einem Zehntel mit 0.1 molarer Natriumoxalat-Lösung als Antikoagulans versetzt und 20 min. scharf abzentrifugiert, um thrombocytenfreies Plasma zu erhalten, das vorsichtig abgehebert wird. 5000 i.E. Streptokinase werden in 5 ml gepufferter physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, diese Lösung wird 1 : 10 verdünnt, so daß eine Lösung von 100 i.E./ml entsteht.

Um den Einfluß der von Streptokinase induzierten Fibrinolyse zu prüfen, werden zu je einem ml Plasma variable Streptasemengen von 20 E bis 1000 E pro ml Plasma hinzugegeben und mit physiologischer Kochsalzlösung, pH 7.4, auf 2 ml aufgefüllt.

Diese Ansätze werden zusammen mit dem Nullwert, bei dem Plasma mit gepufferter physiologischer NaCl-Lösung 1 : 2 verdünnt wird -

verschieden lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Bei den Untersuchungen mit eingefrorenem Plasma betrug die Inkubationszeit in der Regel 2 Std., mit frischem Plasma immer 30 Minuten. Nach dieser Inkubationszeit werden der Faktor XIII, der Fibrinogenspiegel und die Thrombinzeit regelmäßig untersucht. Die durch Streptase induzierte Fibrinolyse wird nach genau definierter Inkubationszeit bei allen Ansätzen gleichzeitig mit Hilfe von Trasylol "Bayer" unterbrochen.

0.2 ml Trasylol (5000 E/ml) werden der ersten Plasmaverdünnung des FSF-Testes und dem Ansatz für die Fibrinogenbestimmung zugesetzt, der sich dadurch wie folgt zusammensetzt:

8.3 ml gepufferte phys. NaCl-Lösung

0.2 ml Trasylol Bayer 5000 E/ml

0.5 ml Ansatz

0.5 ml CaCl_2 -Lösung m/40

0.5 ml Thrombinlösung 20 E/ml

Um die Trasylolmenge im Ansatz des FSF-Testes möglichst niedrig zu halten, wird die erste Verdünnung des Streptaseansatzes folgendermaßen beschickt:

4.3 ml gepufferte phys. NaCl-Lösung

0.2 ml Trasylol 5000 E/ml

0.5 ml Ansatz

Der Ansatz wird also 1 : 10 verdünnt, das Plasma - rechnet man die 1 : 5 Verdünnung im Testansatz des FSF-Testes und die 1 : 2 Verdünnung im Streptaseansatz hinzu - ist demzufolge insgesamt 1 : 100 verdünnt.

Diese Verdünnung wird 15 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um eine optimale Trasylolwirkung zu erzielen. Diese 1 : 100 Verdünnung wird danach so weiterverdünnt, daß durch Überpipettieren von 0.5 ml auf entsprechend mit gepufferter physiologischer NaCl-Lösung beschickte Röhrchen die gewünschten Hunderterstufen der Plasmaverdünnungen für den FSF-Ansatz

zustande kommen, in den 0.2 ml überpipettiert werden. Die Untersuchung der Thrombinzeit wird sofort im Anschluß an die Inkubation des Plasmas mit Streptokinase durchgeführt.

Die Fibrinolyse läßt sich nur zusammen an Thrombin-Zeit und Fibrinogenspiegel beurteilen. Die Thrombin-Zeit als Maß für vorhandenes Antithrombin, bei der Fibrinolyse speziell Antithrombin VI, die Methode der Fibrinogenbestimmung als Maß für gerinnbares Protein ergänzen sich bei diesen Untersuchungen hervorragend.

So kann es sein, daß ein durchaus normaler Fibrinogenspiegel vorgetäuscht wird, eine sehr lange oder sogar schon unendliche Thrombinzeit zeigt, daß man bei der Bestimmung des gerinnbaren Materials in dem Gerinnsel mit eingebaute Fibrinogenspaltprodukte mitbestimmt hat.

III. ERGEBNISSE

1) Einflüsse des Testsystems zur Untersuchung des Fibrinolyse- einflusses auf die Methode der FSF-Bestimmung

a) Einflüsse der Verdünnungsmittel des zu untersuchenden Plasmas

Um mit der angegebenen Methode Untersuchungen anzustellen, müssen zuerst durch die Methode selbst entstehende Fehlbestimmungen, besonders artifizielle Verschiebungen der Faktor XIII Aktivität, ausgeschlossen werden.

Um festzustellen, ob allein durch die Verdünnung des Plasmas durch den Streptokinaseansatz eine Veränderung der Faktor XIII Aktivität hervorgerufen wird, wird Plasma einmal mit physiologischer Kochsalzlösung oder dest. Wasser 1:2 verdünnt und dann 2 Std. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, zum andern zuerst inkubiert und nach der Inkubation mit physiologischer Kochsalzlösung oder dest. Wasser verdünnt.

Tab. 1: Einfluß von Verdünnung und Inkubation auf den FSF-Gehalt des Plasmas

	nach Inkubation Verdünnung mit		vor Inkubation Verdünnung mit	
	phys.NaCl	aqua dest.	phys.NaCl	aqua dest.
E FSF	1100	1000	1100	1100
Fbg	205 mg%	215 mg%	210 mg%	207 mg%

Die Tabelle 1 zeigt, daß weder die Verdünnung an sich, noch die beiden verschiedenen Lösungsmittel eine Verschiebung der Faktor XIII Aktivität oder des Fibrinogenspiegels verursachen.

b) Einfluß der Streptokinase auf die Löslichkeit der Gerinnsel im FSF-Test

Die zweite Frage, ob die Streptokinase selbst einen direkten Einfluß auf den Faktor XIII Spiegel hat, läßt sich nur prüfen, indem man den Leerwert, in dem es zu keiner Fibrinolyse kommen kann, mit wechselnden Mengen Streptase versetzt und feststellt, ob es zu einer Verschiebung der Lösungszeit des Gerinnsels in MCES kommt.

Folgender Ansatz wurde benutzt:

- 0.3 ml phys. NaCl-Lösung
- 0.2 ml FSF-freies-Fbg (0.25 g%)
- 0.2 ml 0.05 m Cystein-Lösung
- 0.1 ml Streptaselösung (500 E bzw. 1000 E)
- 0.2 ml Thrombincalciumlösung

Diese Ansätze wurden mit dem beschriebenen Leerwert 1 Std. bei 37°C inkubiert und mit 2 ml MCES ausgeschüttelt.

Tab. 2: Einfluß der Streptokinase auf die Löslichkeit von Fibrinmonomer in MCES

	0	500 E	1000 E	Streptase/Ansatz
FSF-freies-Fbg.	23.0"	31.0"	33.2"	Lösungszeit sec.

Die Tabelle 2 zeigt, daß die Streptase bei Konzentrationen von 500 und 1000 E pro Ansatz eine geringgradige Verlängerung der Lösungszeit verursacht, also nur eine ganz geringe Erhöhung der Faktor XIII Aktivität verursachen könnte.

Errechnet man aber die bei der vorher angegebenen Methode im Ansatz vorhandene Streptasemenge bei den am meisten gebräuch-

lichen Verdünnungen und Streptasekonzentrationen, so erkennt man, daß die verwendeten Streptokinase-mengen eine Verschiebung der Faktor XIII Aktivität nicht verursachen können (s.Tab. 3).

Tab. 3: Streptokinasekonzentrationen im Ansatz des FSF-Testes bei verschiedenen Verdünnungsstufen des Plasmas

Verd.	10 E	20 E	30 E	40 E	50 E	80 E	Strepto- kinase pro ml Plasma
900	0.011E	0.022E	0.033E	0.044E	0.055E	0.088E	pro Ansatz
1000	0.010E	0.020E	0.030E	0.040E	0.050E	0.080E	"
1100	0.009E	0.018E	0.027E	0.036E	0.045E	0.072E	"
1200	0.008E	0.016E	0.024E	0.032E	0.040E	0.064E	"
1300	0.007E	0.014E	0.021E	0.028E	0.035E	0.056E	"

c) Einflüsse der Antifibrinolytica

Es wurden zwei verschiedene Fibrinolysehemmer untersucht, um das für die beschriebene Methode günstigste, d.h. von Nebenwirkungen auf den Faktor XIII freie Antifibrinolyticum zu finden. Es wurden Trasylol und AMCHA ausgetestet, die ein verschiedenes Wirkungsprinzip als Fibrinolysehemmer haben.

α) Trasylol

Trasylol gehört zu den weitverbreiteten Inhibitoren, die den Organismus vor eigenen und vor fremden Proteasen schützen, und wird aus Rinderorganen gewonnen. Es hat als Polypeptid ein Molekulargewicht von 6 000 und besteht aus einer Peptidkette von 58 Aminosäuren (44).

In seiner Eigenschaft als Proteaseninhibitor ist Trasylol in der Lage, die Fibrinolyse zu hemmen. Es kommt dabei zu einer Inhibition der Streptokinase und somit zur Unterbrechung der Aktivatorbildung. Aber auch die Aktivatorwirkung wird gehemmt, so daß aus Plasminogen kein Plasmin mehr entstehen kann. Die Hauptwirkung des Trasylol besteht aber in einer Hemmung des schon vorher gebildeten Plasmins, wobei dessen fibrinolytische Wirkung gestört wird (32, 78, 79). Der gerinnungsfördernde Effekt des Plasmin in niedriger Konzentration läßt sich von Trasylol demgegenüber nicht stören (4).

Trasylol ist aber nicht nur in der Lage die Fibrinolyse zu hemmen, es kommt auch zur Beeinflussung der Blutgerinnung. Allerdings muß die Dosis, mit der man einen Effekt auf die Gerinnung ausüben kann, wesentlich höher als die für den antifibrinolytischen Effekt sein (4, 5). Es kommt dabei zu einer Hemmung der Thrombinbildung durch Verminderung der Faktor VIII und Faktor V Aktivität. Eine direkte Hemmung von Thrombin tritt aber nicht ein (4, 11). Es ist deshalb zu klären, ob Trasylol irgendeinen Effekt auf den Faktor XIII ausüben kann.

Ergebnisse

Human-Plasma wurde zunächst mit variablen Trasylolkonzentrationen versetzt und eine Stunde lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Diese Ansätze wurden dann im FSF-Test und für die Fibrinogenbestimmung weiterverarbeitet.

Tab. 4: FSF-Bestimmung mit Plasma, das mit variablen Trasylolkonzentrationen bei 37°C inkubiert wird (1 Std.)

Trasylol	OE	500E	1000E	2000E	5000E	10000E	20000E ml/Plasma
FSF	1200E	1300E	1200E	1200E	1300E	1200E	1200E

Man erkennt, daß die Faktor XIII Werte innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite von einer Verdünnungsstufe schwanken (s. Tab. 4). Der Fibrinogenwert wurde in allen Ansätzen unverändert mit 280 mg% bestimmt. Trasylol hat dem zufolge keinen direkten Einfluß auf den Faktor XIII.

Um festzustellen, ob Trasylol einen direkten Einfluß auf die Polymerisation des Fibrinmonomers hat, also passiv eine Störung der letzten Gerinnungsstufe verursachen kann, werden größere Mengen Trasylol dem FSF-Ansatz zugesetzt.

Daraus ergibt sich folgender Ansatz:

0.2 ml Trasylol (5 000 E bzw. 10 000 E/ml)

Leeransatz: 0.2 ml gepufferte NaCl-Lösung 0.9 %

0.2 ml FSF-freies Fbg. (0.25 g%)

0.2 ml 0.05 m Cysteinlösung

0.2 ml entsprechende Plasmaverdünnung

0.2 ml Thrombin Calciumlösung

Es wurde, wie angegeben, 1 Std. bei 37°C inkubiert, danach das entstandene Gerinnsel mit Monochloressigsäure ausgeschüttelt.

Tab. 5: Einfluß von direkt dem Testansatz zugesetzten Trasylolmengen auf die FSF-Bestimmung

Trasylol	0 E	500 E	1000 E	pro Ansatz
FSF	1200 E	1100 E	1200 E	

Auch bei diesem Ansatz zeigt sich, daß der Faktor XIII-Wert sich nur innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite verschiebt (s. Tab. 5). Auch im direkten Zusatz zum FSF-Test ändert Trasylol den Faktor XIII-Wert nicht, hat also auch keinen Einfluß auf die Polymerisationsfähigkeit des verwendeten Testfibrinogens.

Errechnet man, wie bei der Streptokinase, die bei der anfangs angegebenen Methode im Ansatzröhrchen des FSF-Testes vorhandene Trasylolmenge, so erkennt man, daß bei diesen geringen Mengen kein Einfluß auf die Faktor XIII Bestimmung zustande kommen kann (s. Tab. 6).

Tab. 6: Trasylolkonzentrationen im Ansatz des FSF-Testes bei verschiedenen Verdünnungsstufen

Verd.	700	800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500
E Trasylol/ Ansatz	5.71	5.00	4.33	4.00	3.63	3.33	3.08	2.86	2.66

Um zu zeigen, daß Trasylol auf die Gerinnungszeit des FSF-Testes keinen wesentlichen Einfluß hat, wird folgender Ansatz durchgeführt.

0.1 ml Trasylol (10 000 E/ml)

Leerwert: 0.1 ml physiologische, gepufferte NaCl-Lösung

0.1 ml Plasma oder FSF-freies Testfg. (0.25 g%)

Der Ansatz wird etwa 20 sec. bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Gerinnungszeit nach Zusatz von 0.1 ml Thrombincalciumlösung (10 E/ml m/40 CaCl₂-Lösung) bestimmt.

In diesem Ansatz ist die Gerinnungszeit einzig ein Maß für die Thrombinreaktion mit Fibrinogen, abhängig in diesem Falle von den Eigenschaften des Fibrinogens, so daß eventuelle Veränderungen, hervorgerufen durch Trasylol, nachgewiesen werden können.

Tab. 7: Einfluß von Trasylol auf die Gerinnungszeit, von Plasma und Testfibrinogen nach Zusatz von Thrombin-calciumlösung

Trasylol	0 E	1 000 E	pro Ansatz
Plasma	13.8"	10.6"	Gerinnungszeit
Test-Fbg	12.8"	11.0"	"

Der Versuch zeigt, daß Trasylol zu einer geringfügigen Verkürzung der Gerinnungszeit führt, die bei Plasma deutlicher als bei Testfibrinogen ausgeprägt ist (s. Tab. 7).

2) AMCHA

Die zweite Gruppe der Antifibrinolytica wird charakterisiert durch 4-Amino-methyl-cyklohexan-Carbonsäure (AMCHA),



eine Substanz, deren Wirkungsprinzip ähnlich der ϵ -Aminocapronsäure ist, die nur bei gleicher Dosierung eine wesentlich schwächere Wirkung hat (80).

In erster Linie wirkt AMCHA über eine Hemmung der Plasminogenaktivierung, hat aber zusätzlich einen Antiplasmineffekt (7). AMCHA verursacht eine kompetitive Hemmung der Plasminogenaktivierung, bei gleichzeitiger nicht kompetitiver Hemmung der Plasminaktivität (19).

Als Nebenwirkung haben verschiedene Autoren eine Verlängerung der Thrombinzeit bei zu starker Dosierung von AMCHA feststellen können (7, 19).

Es ist also hier zu untersuchen, inwieweit AMCHA auf die zweite Gerinnungsphase einen Einfluß hat, der möglicherweise AMCHA für diese Methode als Antifibrinolyticum ungeeignet macht.

Ergebnisse

Human-Plasma wurde mit variablen AMCHA-Mengen versetzt und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden FSF und Fibrinogen bestimmt.

Tab. 8: FSF-Bestimmung mit Plasma, das mit variablen AMCHA-Konzentrationen bei 37°C inkubiert wird

AMCHA	0	20 mg	50 mg pro Ansatz
E FSF	1200	1200	1200

Es zeigt sich, daß AMCHA selbst bei 50 mg/ml Plasma keine Faktor XIII Verschiebung verursacht (s. Tab. 8). Das Fibrinogen bleibt mit 250 mg% konstant.

Um den Einfluß auf den FSF-Test direkt zu zeigen, werden variable AMCHA-Mengen dem Gerinnungsansatz des FSF-Testes anstelle der 0.2 ml physiologischen Kochsalzlösung zugesetzt.

Tab. 9: Einfluß von direkt dem Testansatz zugesetzten variablen AMCHA-Konzentrationen auf die FSF-Bestimmung

AMCHA	0 mg	10 mg	20 mg pro Ansatz
E FSF	1100	1500	nicht zu beurteilen

Durch direkten AMCHA-Zusatz zum FSF-Test kommt es zu einer Erhöhung des Faktor XIII Wertes (s. Tab. 9).

Setzt man 20 mg pro Ansatz zu, läßt sich der Test nicht mehr mit hinreichender Genauigkeit durchführen. Die entstandenen Gerinnsel sind vollkommen durchscheinend und können deshalb im Lösungsmittel nicht mehr genau erkannt werden, so daß man zumindest nicht mehr feststellen kann, wann sich das Gerinnsel vollkommen gelöst hat. Man kann also aus diesem Befund schon schließen, daß die Faktor XIII Erhöhung durch eine Veränderung am Fibrinogen hervorgerufen ist.

Errechnet man die AMCHA-Mengen, die in den Gerinnungsansatz des FSF-Testes nach Vorinkubation des Plasmas mit AMCHA (Tab.8) überpipettiert werden, so sieht man, daß diese AMCHA-Mengen im FSF-Ansatz noch nicht ausreichen, um eine FSF-Erhöhung vorzutäuschen (s. Tab. 10).

Tab. 10: AMCHA-Konzentrationen im Ansatz des FSF-Testes bei verschiedenen Verdünnungsstufen

Verdünnung des Plasmas	1100	1200	1300	1400	
20 mg/ml Plasma bei Vorink.	0.018	0.016	0.015	0.014	mg AMCHA pro Ansatz
50 mg/ml Plasma bei Vorink.	0.045	0.041	0.038	0.035	mg AMCHA pro Ansatz

Um nachzuweisen, daß die Titerverschiebung des FSF nicht durch Erhöhung der Faktor XIII Aktivität verursacht wird, setzt man zu dem im FSF-Test angegebenen Leerwert anstelle der physiologischen Kochsalzlösung variable Mengen von AMCHA zu, inkubiert 1 Std. bei 37°C und prüft die Lösungszeit des ent-

standenen Gerinnsels in 2 ml MCES.

Tab. 11: Einfluß von variablen AMCHA-Konzentrationen auf die Löslichkeit von Fibrinmonomer in MCES (s.auch Abb. 6)

AMCHA	0	0.01	0.1	1	2	5	10 mg/Ansatz
Lösungszeit in Sekunden	19.5"	19.8"	23.5"	31.3"	32.4"	43.8"	52.6"

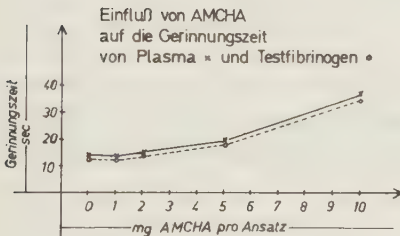
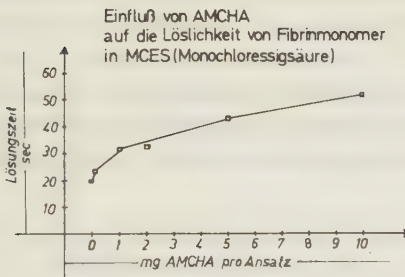


Abb. 6: Einfluß von AMCHA auf die Löslichkeit von Fibrinmonomer in MCES und auf die Gerinnungszeit von Plasma und Testfibrinogen

Zunehmende AMCHA-Mengen verursachen eine Verlängerung der Gerinnungslösungszeit, die natürlich eine Faktor XIII Erhöhung vortäuschen kann (s. Tab. 11 u. Abb. 6).

Prüft man wie bei Trasylol noch die Gerinnungszeit des Ansatzes nach dem beschriebenen Schema (Tab. 7), indem man anstelle von 0.1 ml Trasylol 0.1 ml variable AMCHA-Verdünnungen mit Plasma oder Testfibrinogen versetzt und mit Thrombin-calcium die Gerinnungszeit prüft, so erkennt man, daß der durch AMCHA hervorgerufene Faktor XIII Wert keiner echten Aktivitätsvermehrung entspricht, sondern durch eine Veränderung der Thrombinreaktion mit dem Fibrinogen hervorgerufen wird (s. Abb. 6 u. Tab. 12).

Tab. 12: Einfluß von variablen AMCHA-Konzentrationen auf die Gerinnungszeit von Plasma und Testfibrinogen nach Zusatz von Thrombin-Calcium-Lösung (s. auch Abb. 6).

AMCHA	0	1	2	5	10	mg pro Ansatz
Plasma	13.8"	13.0"	14.5"	18.8"	35.5"	Gerinnungszeit
Testfbg.	12.8"	12.2"	13.5"	17.5"	33.9"	"

Trasylol ist nach den beschriebenen Versuchsergebnissen als Antifibrinolyticum im Testansatz wesentlich besser geeignet als AMCHA, weil es zu keiner Beeinflussung der Versuchsergebnisse führen kann.

2) Einfluß von veränderten Testfibrinogenkonzentrationen auf die Faktor XIII Werte im FSF-Test

Bei den Untersuchungen über das Verhalten des Faktor XIII unter Einfluß von Streptokinase wird im FSF-Test eine Testfibrinogenkonzentration von 0.25 g%, also 0.5 mg pro Ansatzröhrchen, benutzt. Die sonst übliche, nach HEENE standardisierte Fibrinogenkonzentration beträgt 0.5 g%, also 1 mg pro Ansatzröhrchen (36).

Um die Ergebnisse bei den Fibrinolyseansätzen mit den Faktor XIII Werten bei der üblichen Testanordnung vergleichen zu können, wird Plasma verschieden vorverdünnt, so daß in den Plasmaverdünnungen verschiedene Faktor XIII Konzentrationen auftreten; in diesen verschiedenen Plasmalösungen werden die Faktor XIII Werte bei den beiden verschiedenen Testfibrinogenkonzentrationen von 0.5 g% und 0.25 g% ermittelt (s. Tab. 13).

Tab. 13: Abhängigkeit der FSF-Aktivität von der Testfibrinogenkonzentration (s. auch Abb. 7)

E FSF bei 0.25 g% Fbg	600	1000	1200	1300
E FSF bei 0.5 g% Fbg	300	500	800	1100

Trägt man die Werte gegeneinander auf, so erkennt man, daß der Kurvenverlauf annähernd einer Hyperbel entspricht. Aus diesem Kurvenverlauf kann man schließen, daß es sich bei der Umsetzung des Fibrinmonomers durch den Faktor XIII um eine enzymatische Reaktion handelt (Abb. 7).

Trägt man die erhaltenen FSF-Werte in Form einer Lineweaver-Burk Kurve auf (56) (Abb. 7), so wird der Enzymcharakter der Reaktion noch deutlicher. Aus dieser Kurve kann man aber keine spezifischen Eigenschaften des Enzyms Faktor XIII ab-

lesen, da man die Michaeliskonstante nicht errechnen kann, weil man die dazu nötige Substratkonzentration nicht kennt.

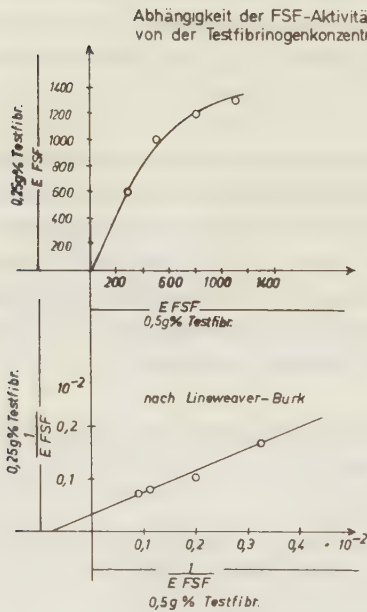


Abb. 7: Abhängigkeit der FSF-Aktivität von der Testfibrinogenkonzentration

Will man nun die FSF-Werte bei den verschiedenen Fibrinogenkonzentrationen miteinander vergleichen, so sieht man, daß bei hohen FSF-Werten keine größeren Differenzen auftreten, daß aber bei niedrigeren Werten bei 0.25 g% deutlich höhere Werte auftreten als bei 0.5 g%.

Erhält man zum Beispiel bei 0.5 mg Fbg pro Ansatz einen FSF-Abfall von 1300 E auf 900 E, so entspräche das einem Abfall bei 1 mg pro Ansatz von 1100 E auf 400 - 500 E.

Bei 0.25 g% erhält man also geringere Unterschiede in der FSF-Konzentration, als man bei 0.5 g% erhalten hätte.

3) Einfluß der Streptokinase - induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit

a) Untersuchungen mit gelagertem Humanplasma

Um für die Untersuchungen mit Streptokinase ein genau standardisiertes Plasma zu haben, wurde Oxalatplasma von verschiedenen Normalpersonen, gemischt mit schon länger bei - 20°C gelagertem Oxalatplasma, in einzelnen kleinen Portionen bei - 20°C eingefroren.

Die Inkubationszeit mit Streptokinase betrug 2 Stunden. Beim ersten Testansatz kam es zu einem Abfall der FSF-Aktivität von 1100 E auf 800 E. Dieser Aktivitätsverlust durch die induzierte Fibrinolyse ließ sich nun um so schlechter reproduzieren, je länger das Plasma eingefroren war.

Nach dem initialen Abfall bleibt der Faktor XIII bei den ersten beiden Festreihen konstant, auch dann, wenn das Fibrinogen vollkommen lysiert ist.

Nachdem das Plasma 26 Tage eingefroren war, ließ sich der Faktor XIII-Abfall nicht mehr wiederholen (s. Tab. 14 u. Abb. 8). Eine Verkürzung der Inkubationszeit auf 30 min zeigte, daß trotz unverändert induzierbarer Fibrinolyse der Faktor XIII konstant bleibt (s. Tab. 15).

Tab. 14: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit eines verschieden lang bei -20°C gelagerten Poolplasma. Inkubationszeit mit Streptokinase 2 Stunden (s.a. Abb. 8)

E Streptase/ ml Plasma	0	10	20	30	40	50	60	70	80	100
8-9 Tage gelagert E FSF	1100	800	900	800	800	800	800	700	800	-
12-14Tg. gelagert E FSF	1000	900	800	800	800	800	800	800	800	800
17-19Tg. gelagert E FSF	1100	1000	900	800	900	1000	1000	900	1000	900
26 Tage gelagert E FSF	1000	900	1000	1000	1100	-	-	-	-	-
Fibrinogen mg %	208	208	204	193	151	145	135	103	18	0
Thrombin- zeit sec.	25.0	26.2	26.6	29.8	36.4	46.0	62.4	76.8	138.2	00

Tab. 15: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII und Fibrinogen des 26 Tage bei -20°C gelagerten Poolplasmas. Inkubationszeit mit Streptokinase 30 Minuten

E Streptase/ml Plasma	0	10	30	50	70
E FSF	1100	1000	1100	1100	1000
Fibrinogen mg%	210	210	210	210	155

Fibrinolyseeinfluß auf gelagertes Poolplasma

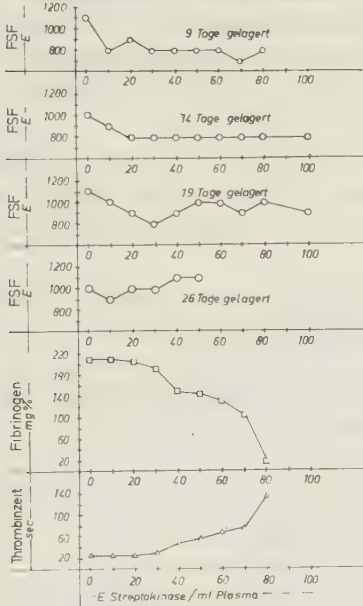


Abb. 8: Fibrinolyseeinfluß auf gelagertes Poolplasma

Die Fibrinogenwerte zeigen, daß es erst bei 30 E Streptokinase pro ml Plasma zu einem signifikanten Abfall der Werte kommt. Ebenso steigt erst bei 30 E Streptokinase pro ml Plasma die Thrombinzeit deutlicher an.

Der Abfall des Faktor XIII ist also nur bei den Streptokinasekonzentrationen zu beobachten, bei denen es noch nicht zu einer deutlich erkennbaren Fibrinogenolyse gekommen ist.

Zusammenfassend kann man nach den Untersuchungen am gepoolten und gelagerten Plasma folgendes feststellen.

1. Es kommt zu einem geringgradigen Faktor XIII-Abfall, der - umgerechnet auf eine Fibrinogenkonzentration von 0.5 g% im Testansatz - etwa 40 - 50 % der Ausgangsaktivität ausmacht.
2. Der Faktor XIII-Abfall ist bei derjenigen Streptokinasekonzentration abgeschlossen, bei der es zum ersten signifikanten Fibrinogenabfall und Anstieg der Thrombinzeit kommt.
3. Der Faktor XIII-Wert ist auch bei vollkommener Proteolyse des Fibrinogens nicht mehr weiter zu senken.
4. Der Faktor XIII-Abfall läßt sich um so schlechter reproduzieren, je länger das Plasma eingefroren ist.

b) Untersuchungen mit frischem Humanplasma

Um die Aktivierungsphase der Fibrinolyse, bei der nach den Untersuchungen am gelagerten Plasma der Aktivitätsverlust des Faktor XIII zustandekommt, deutlich sichtbar zu machen, wurde die Inkubationszeit des Plasmas mit Streptase auf 30 min verkürzt. Das auf die beschriebene Art erhaltene Plasma wurde sofort nach der Zentrifugation mit Streptokinase versetzt, so daß eventuelle Veränderungen durch Lagern des Plasmas nicht zu erwarten sind.

Von drei verschiedenen Normalpersonen ergaben sich folgende typische Werte: Tab. 16, 17, 18 u. Abb. 9, 10, 11.

Tab. 16: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit des frischen Normalplasmas (Fall 1) (s.a. Abb. 9)

E Streptase/ml Plasma	0	20	40	60	80
E FSF	1300	1100	900	900	900
mg% Fibrinogen	200	215	200	160	125
sec. Thrombinzeit	30.0	30.4	53.0	83.2	99.2

Tab. 17: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit des frischen Normalplasmas (Fall 2) (s.a. Abb. 10)

E Streptase/ml Plasma	0	20	40	60	80
E FSF	1200	1000	900	900	900
mg% Fibrinogen	220	210	180	150	130
sec. Thrombinzeit	18.5	20.0	31.5	33.5	43.0

Tab. 18: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit des frischen Normalplasmas (Fall 3) (s.a. Abb. 11)

E Streptase/ml Plasma	0	20	40	60	80
E FSF	1200	900	900	900	900
mg% Fibrinogen	220	215	220	150	70
Thrombinzeit sec.	20.0	20.0	38.0	47.0	∞

Fibrinolyseeinfluß auf
frisches Normalplasma (Fall 1)

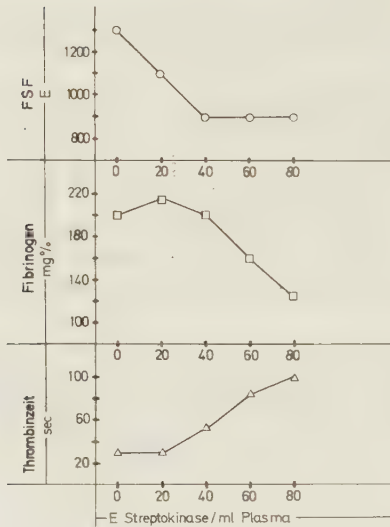


Abb. 9: Fibrinolyse-
einfluß auf frisches
Normalplasma (Fall 1)

Fibrinolyseeinfluß auf
frisches Normalplasma (Fall 2)

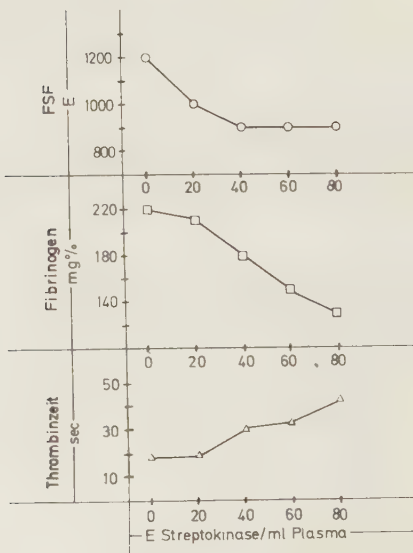


Abb.10: Fibrinolyse-
einfluß auf frisches
Normalplasma (Fall 2)

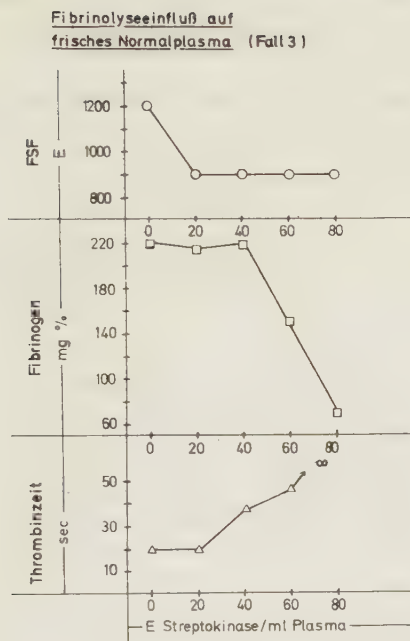


Abb. 11: Fibrinolyseeinfluß auf frisches Normalplasma (Fall 3)

Die Fibrinolyse läßt sich, wie die drei Fälle zeigen, wegen der individuell verschiedenen Streptokinaseresistenz nicht immer im gleichen Ausmaß induzieren, so daß man bei verschiedenen Individuen trotz konstanter Streptokinasekonzentration gleiche Fibrinolyseaktivität nicht erwarten kann.

Insgesamt wurden mit frischem Plasma sieben Untersuchungsreihen durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung ergaben sich folgende Parameter (31). $\bar{M}$ bedeutet Mittelwert, n die Zahl der Untersuchungen, σ die Standardabweichung, σ_M die mittlere Standardabweichung und p die Wahrscheinlichkeit (s. Tab. 19 u.

Abb. 12).

Tab. 19: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit des frischen Normalplasmas.

Statistische Auswertung (32) aller untersuchten Normalpersonen.

Statistische Parameter: M = Mittelwert
n = Zahl der untersuchten Fälle
 σ = Standardabweichung
 σ_M = mittlere Standardabweichung (s.a. Abb. 12)

FSF

E Streptase/ ml Plasma	M	n	σ	σ_M	M $\pm$ σ_M
0 E	1171 E	7	95 E	36 E	1207 - 1135 E
20 E	1014 E	7	121 E	46 E	1060 - 968 E
40 E	928 E	7	49 E	18 E	946 - 910 E
60 E	942 E	7	79 E	30 E	972 - 912 E
80 E	933 E	6	51 E	21 E	954 - 912 E

Fibrinogen mg%

E Streptase/ ml Plasma	M	n	σ	σ_M	M $\pm$ σ_M
0 E	206	7	16	6	212 - 200
20 E	208	7	11	4	212 - 204
40 E	179	7	29	11	190 - 168
60 E	151	6	32	13	164 - 138
80 E	72	6	49	20	92 - 52

Thrombinzeit sec.

E Streptase/ ml Plasma	M	n	σ	σ_M	M $\pm$ σ_M
0 E	20.5	5	5.6	2.5	23.0-18.0
20 E	21.1	5	5.6	2.5	23.6-18.6
40 E	33.3	5	13.4	6.0	39.3-27.3
60 E	44.3	5	23.3	10.4	54.7-33.9
80 E	106.0	5	73.0	33.0	139.0-73.0

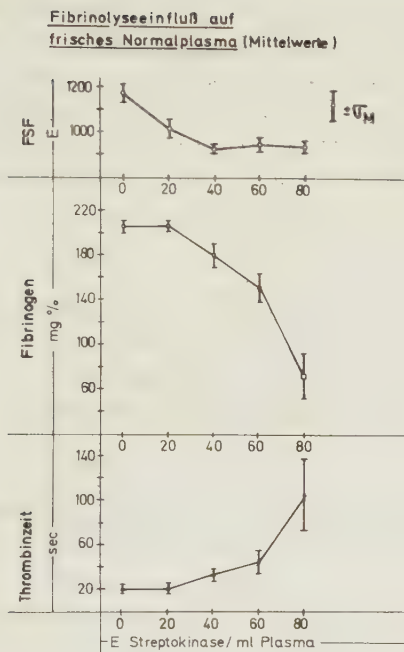


Abb. 12: Fibrinolyseeinfluß auf frisches Normalplasma
(Mittelwerte)

Errechnet man noch die statistische Signifikanz der erhaltenen Werte, so wird deutlich bei welcher Streptokinasekonzentration die ersten entscheidenden Veränderungen auftreten. p ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß in zwei Untersuchungsreihen gemessene Werte statistisch signifikant differieren. $p = 0.02$ bedeutet zum Beispiel: die Wahrscheinlichkeit, daß der gefundene Unterschied auf einem Zufall beruht, beträgt 2 %. Bei biologischen Meßreihen genügt ein p von 0.05, um einen statistisch signifikanten Unterschied nachzuweisen (31).

Der FSF-Aktivitätsverlust zwischen 0 E und 20 E Streptokinase pro ml Plasma ist statistisch deutlich signifikant ($p = 0.02$), während der FSF-Abfall von 20 E zu 40 E Streptokinase zwar deutlich ist, aber nicht als statistisch signifikant bezeichnet werden kann ($p = 0.1$). Der erste signifikante Fibrinogenabfall kommt zwischen 20 E Streptokinase und 40 E Streptokinase zustande ($p = 0.02$), während bei 20 E Streptokinase eine Fibrinogenerniedrigung noch nicht auftritt.

Bei der Thrombinzeit kommt es zwar schon zwischen dem Nullwert und 40 E Streptase pro ml zu einer deutlichen Zunahme der Gerinnungszeit ($p = 0.07$), statistisch signifikant ist die Zunahme der Thrombinzeit erst zwischen dem Nullwert und 60 E Streptase pro ml Plasma ($p = 0.01$).

Der Faktor XIII-Abfall ist bei derjenigen Streptasekonzentration abgeschlossen, bei der sich die erste signifikante Fibrinogenerniedrigung bzw. Thrombinzeitverlängerung zeigt. Die weiterhin abfallenden Fibrinogenwerte und zunehmenden Thrombinzeiten machen deutlich, daß trotz gut induzierbarer Fibrinolyse eine weitere Faktor XIII-Erniedrigung nicht auftritt. Um zu demonstrieren, daß auch im vollkommen lysierten Plasma der Faktor XIII nicht verschwindet, wurde Plasma mit 500 und 1000 E Streptase pro ml Plasma versetzt.

Tab. 20: Einfluß hoher Streptokinasekonzentration auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit

E Streptase/ml Plasma	0	500	1000
E FSF	1100	1000	1000
mg% Fibrinogen	210	Ø	Ø
sec. Thrombinzeit	14.0	00.	00

Man erkennt, daß es trotz nicht mehr nachweisbarem Fibrinogen und unendlicher Thrombinzeit bei beiden Streptokinasekonzentrationen zu keinem weiteren Faktor XIII-Abfall mehr kommt (s. Tab. 20). Der Faktor XIII-Abfall ist in diesem Fall sogar wesentlich geringer als bei den vorher untersuchten niedrigeren Streptokinasekonzentrationen.

Zusammenfassend kann man also folgendes feststellen:

1. Entsprechend den Befunden am gepoolten Plasma sieht man einen Faktor XIII-Abfall, der bei derjenigen Streptasekonzentration abgeschlossen ist, bei der es zur ersten signifikanten Fibrinogenerniedrigung und Thrombinzeitverlängerung gekommen ist.
2. Die Faktor XIII-Aktivität ist auch im vollkommen lysierten Plasma nicht weiter abgesunken, also unabhängig von der Fibrinogenkonzentration des Plasmas.

c) Untersuchungen mit Hämophilie-A-Plasma

Wie schon in der Einleitung beschrieben, haben JUNG und DUCKERT (41) und AMRIS (5) eine Aktivitätszunahme des Faktor VIII in der Aktivierungsphase der Fibrinolyse gezeigt, bei der noch nicht deutliche Veränderungen der Fibrinogenwerte auftreten. Es ist deshalb naheliegend die Faktor XIII-Verschiebung eventuell in einen Zusammenhang mit dieser Faktor VIII-Erhöhung zu bringen. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen am Hämophilie A-Plasma genauso durchgeführt wie die mit frischem Plasma. Die Inkubationszeit des Plasmas mit Streptokinase betrug wiederum 30 Minuten.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tab. 21: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit des frischen Hämophilie-A-Plasma (Fall 1) (s.a. Abb. 13)

E Streptase/ ml Plasma	0	20	40	60	80	500
E FSF	1100	1100	1100	1100	1100	1000
mg% Fibrinogen	442	438	410	345	300	160
Thrombinzeit sec.	18	21	42	49	61	00

Tab. 22: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf Faktor XIII, Fibrinogen und Thrombinzeit des frischen Hämophilie-A-Plasma (Fall 2) (s.a. Abb. 14)

E Streptase/ ml Plasma	0	20	40	60	80
E FSF	1000	1100	1000	1100	1100
mg% Fibrinogen	320	320	286	205	110
Thrombinzeit sec.	19.8	20.8	24.4	35.0	46.2

Beide Hämophilie-A-Patienten waren in ihren sonstigen Gerinnungsbefunden vollkommen normal. Sie hatten einzig die für Hämophilie-A-typischen Veränderungen, wobei bei Fall 1 der Faktor VIII-Wert bei 1.8 %, bei Fall 2 bei unter 1 % lag.

Fibrinolyseeinfluß auf
frisches Hämophilie-A-Plasma (Fall 1)

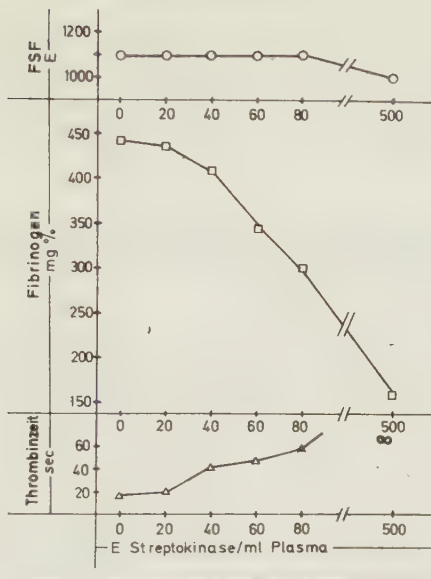


Abb. 13: Fibrinolyse-
einfluß auf frisches
Hämophilie-A-Plasma
(Fall 1)

Fibrinolyseeinfluß auf
frisches Hämophilie-A-Plasma (Fall 2)

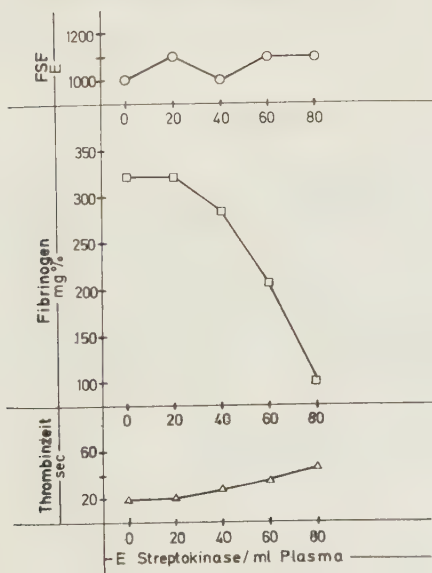


Abb. 14: Fibrinolyse-
einfluß auf frisches
Hämophilie-A-Plasma
(Fall 2)

Bei Fall 2 handelte es sich zusätzlich um eine Hemmkörperhämophilie.

Bei beiden Befunden ist deutlich, daß ein Faktor XIII-Abfall trotz normal induzierbarer Fibrinolyse nicht zu messen ist. Die Faktor XIII-Werte streuen in der zulässigen Fehlerbreite von einer Verdünnungsstufe (s. Tab. 21, 22 u. Abb. 13, 14).

4) Einfluß der Fibrinogenspaltprodukte auf die Thrombin-gerinnungszeit des Testfibrinogens

Um festzustellen, ob die Splits trotz der hohen Plasmaverdünnungen einen Einfluß auf die Gerinnungszeit des Testfibrinogens und somit auch auf die des Testansatzes haben, wurde Plasma mit 1000 E Streptase pro ml so lysiert, daß die Thrombinzeit, gemessen nach einer Inkubation des Plasmas mit Streptase von 30 min., unendlich war. Das lysierte Plasma wurde dann auf eine Endverdünnung von 1 : 500 und 1 : 1000 gebracht und dem Ansatz zur Messung der Thrombingerinnungszeit zugesetzt.

Es ergaben sich folgende Werte:

1. 0.1 ml Testfibrinogen 0.5 g%
0.1 ml phys. NaCl
0.1 ml Thrombinlösung
Gerinnungszeit: 16 sec.
2. 0.1 ml Testfibrinogen 0.5 g%
0.1 ml Streptolysiertes Plasma 1 : 500
0.1 ml Thrombinlösung
Gerinnungszeit: 15.6 sec.
3. 0.1 ml Testfibrinogen 0.5 g%
0.1 ml Streptolysiertes Plasma 1 : 1000
0.1 ml Thrombinlösung
Gerinnungszeit: 16.1 sec.

Aus diesen Werten ergibt sich eindeutig, daß Fibrinogenspaltprodukte in solch hohen Verdünnungen dem Testfibrinogen zugeführt, die Gerinnungsfähigkeit des Testfibrinogens nicht beeinflussen, also keinen Einfluß auf die Eigenschaften des Testfibrinogens im FSF-Test haben können.

5) Einfluß der Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf die Faktoren VIII und V

Um festzustellen, ob unter den angegebenen Testbedingungen die Ergebnisse von JUNG und DUCKERT (41) und AMRIS (5) zu reproduzieren sind, wurde frisches Plasma mit den gleichen Streptasedosen wie bei den Faktor XIII Untersuchungen 30 min. inkubiert und danach sofort die Faktoren V und VIII bestimmt.

Zum anderen wurde das schon untersuchte Plasma etwa 2 1/2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen, und der gleiche Ansatz wiederholt. Das Ausmaß der induzierten Fibrinolyse wurde durch die Thrombinzeit kontrolliert und entsprach bei allen Untersuchungen, den beschriebenen Werten bei den Faktor XIII Ergebnissen.

a) Verhalten des Faktor VIII

Bei niedrigen Streptasekonzentrationen tritt ein excessiver Anstieg der Faktor VIII-Aktivität auf, der bei 40 E Streptokinase pro ml Plasma abgeschlossen ist. Danach kommt es zu einem ebenso schnellen Abfall des Faktors, der bei hohen Streptokinasedosen von 500 und 1000 E nur noch geringgradig nachzuweisen ist (s. Tab. 23 u. Abb. 15).

Tab. 23: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf den Faktor VIII (s.a. Abb. 15)

Streptase/ ml Plasma			E	0	20	40	60	80	500	1000
Fall 1	frisch	%		155	220	350	270	105		
Fall 1	gelagert	%		68	110	350	250	170		
Fall 2	frisch	%		68	110	325	155	88	5.8	3.4
Fall 2	gelagert	%		44	86	325	100	55		

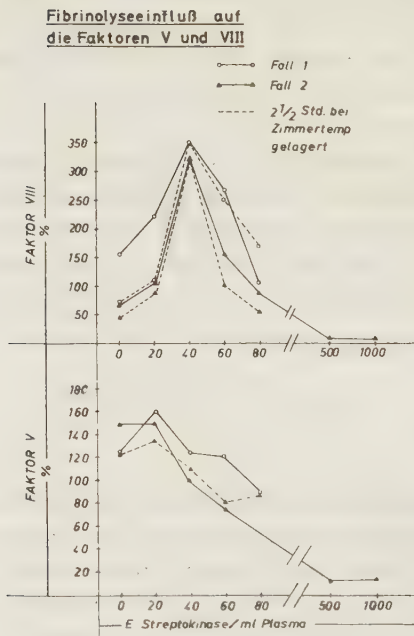


Abb. 15: Fibrinolyseeinfluß auf die Faktoren V und VIII

b) Verhalten des Faktor V

Der Faktor V-Anstieg läßt sich unter den verwendeten Untersuchungsmethoden nicht so ausgedehnt nachweisen wie die Zunahme der Faktor VIII-Aktivität. Es kommt aber auch zu einem Faktor V-Anstieg, der schon bei 20 E Streptase pro ml Plasma abgeschlossen ist, mit nachfolgendem deutlichen Verlust an Aktivität bei hohen Streptokinasedosen (s. Tab. 24 u. Abb. 15).

Tab. 24: Einfluß der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf den Faktor V (s.a. Abb. 15)

Streptase/ ml Plasma			E	0	20	40	60	80	500	1000
Fall 1	frisch	%		125	160	125	120	90		
Fall 2	frisch	%		150	150	100	74	75	12	14
Fall 2	gelagert	%		125	135	110	80	90		

6) Einfluß von Thrombinspuren auf die Faktor XIII-Aktivität im Plasma

Von verschiedenen Autoren wurde eine Faktor VIII und auch Faktor V-Zunahme durch Thrombinspuren, die noch nicht zur Gerinnung des Plasmas führen, nachgewiesen (86, 87).

Es ist deshalb naheliegend, zu untersuchen, wie sich diese Thrombinspuren auf die Faktor XIII-Aktivität auswirken.

Plasma wird mit variablen Thrombinkonzentrationen versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wird festgestellt, welche Thrombinkonzentration noch nicht zur Gerinnung des Plasmas geführt hat.

0.1 E Thrombin pro ml Plasma war bei diesen Untersuchungen in der Regel die höchste Thrombinkonzentration, die noch nicht zur

Gerinnung führt. Bei vier verschiedenen Ansätzen kam es zu einem Abfall der Faktor XIII-Aktivität um ein oder zwei Verdünnungsstufen.

Tab. 25: FSF-Aktivität in bei 37°C mit Thrombinspuren inkubierten Normalplasmen. Einzelbestimmungen, Inkubationszeit: 30 min.

E Thrombin/ml Plasma	0	0.1
(1)	1200 E	1000 E FSF
(2)	1300 E	1100 E FSF
(3)	1100 E	900 E FSF
(4)	1100 E	1000 E FSF

Errechnet man die statistischen Parameter, so ergeben sich folgende Werte (31):

Tab. 26: FSF-Aktivität in bei 37°C mit Thrombinspuren inkubiertem Normalplasma.

Statistische Auswertung aller untersuchten Normalpersonen.

Statistische Parameter: M = Mittelwert

n = Zahl der untersuchten Fälle

σ = Standardabweichung

σ_M = mittlere Standardabweichung

	M	n	σ	σ_M	M $\pm$ σ_M
0 E Thrombin	1175 E	4	96 E	48 E	1223 - 1127
0.1 E Thrombin	1000 E	4	82 E	41 E	1041 - 954

Der Aktivitätsverlust ist mit $p = 0.025$ statistisch signifikant.

Dieser Faktor XIII-Abfall ist durch die Befunde von BULUK (13) und LORAND u. KONISHI (67) zu erklären (s. Tab. 25). Es kommt also nach der Aktivierung des FSF zu einem Verlust der Aktivität, die sich dann im FSF-Test als Differenz gegenüber dem O-Wert ausweist, da im FSF-Test nur maximale Faktor XIII-Aktivität gemessen wird.

Es ist nicht ohne weiteres einzusehen, daß wie in diesem Fall eine Aktivierung des FSF ohne Calcium möglich ist. Dennoch kann in Erwägung gezogen werden, daß geringe FSF-Mengen ohne Calcium aktiviert werden können; naheliegend ist aber anzunehmen, daß noch geringe Calciumspuren für die FSF-Aktivierung trotz Oxalat im Plasma vorhanden sind.

IV. DISKUSSION

1) Spezifität des verwendeten FSF-Testes

Zur Untersuchung des FSF-Gehaltes wurde die Methode nach HEENE et al. (36) angewandt, bei der hochgereinigtes FSF-freies Fibrinogen als Substrat für das zu untersuchende Plasma benutzt wird. Thrombin bringt mit Calcium dieses Fibrinogen zur Gerinnung und dient gleichzeitig dem im Plasma vorliegenden Faktor XIII als Aktivator. Diese Aktivierung kann erst durch den Zusatz von Cystein voll zustande kommen, da wie schon beschrieben, SH-Gruppen für die Aktivierung von Transamidasen nötig sind (58).

Als Maß für die FSF-Aktivität wird die höchstmögliche Plasma-verdünnung in Einheiten (E) angegeben, die ausreicht ein Gerinnsel so zu stabilisieren, daß es nicht innerhalb einer Minute in Harnstoffoxalat- oder Monochloressigsäurelösung löslich ist.

Einen entscheidenden Einfluß auf die FSF-Bestimmung übt die verwendete Testfibrinogenkonzentration aus, da es durch eine Verschiebung der Testfibrinogenkonzentration auch zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Enzym zu Substrat kommt. Der FSF-Test ist nach HEENE mit einer 0.5g% Testfibrinogenlösung standardisiert. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde eine 0.25 g% Fibrinogenlösung als Testsubstanz benutzt. Es kommt dabei in der Regel zu höheren FSF-Aktivitäten als bei einer 0.5 g% Testfibrinogenlösung, wobei aber die FSF-Werte bei hohen Plasmaaktivitäten weniger differieren, als bei niedrigeren, wie aus Untersuchungen über die Enzym-Substrat-Verhältnisse bei FSF und Fibrinogen hervorgeht (vgl. Seite 37). Das hat zur Folge, daß die bei den verschiedenen Streptokinasekonzentrationen bestimmten Erniedrigungen der FSF-Aktivität noch deutlicher ausgefallen wären, wenn sie mit einer 0.5 g% Testfibrinogenlösung bestimmt worden wären.

Entsprechend der Anordnung des Testes ist die FSF-Bestimmung in keiner Weise von dem im Plasma vorhandenen Fibrinogen und dessen Beschaffenheit abhängig. Auch die Verhältnisse in der Vorphase und der 1. Phase der Gerinnung in dem zu untersuchen- den Plasma haben entsprechend der Testanordnung keinen Einfluß auf die FSF-Bestimmung, da sowohl Thrombin als auch Cystein dem Test im Überschuß zugesetzt werden.

Eine Veränderung ist in diesem Testsystem infolgedessen nur durch folgende Umstände möglich.

1. Im Plasma liegt ein Inhibitor des Faktor XIII vor. In diesem Falle müßte jedoch die Löslichkeit der Testgerinnung bei niedrigen Plasmaverdünnungen besser, bei hohen jedoch schlechter sein, da bei höheren Verdünnungsgraden ein "Herausverdünnen" des Inhibitors angenommen werden müßte. Ein solcher Effekt wurde nicht beobachtet.
2. Es werden dem Testansatz Substanzen zugesetzt, die die Gerinnungs- und Polymerisationsfähigkeit des Testfibrinogens verändern, und somit auch eine Veränderung der FSF-Aktivität vortäuschen könnten.

Da Thrombin und Cystein zusammen mit Calcium im Überschuß, und Fibrinogen in konstanter Konzentration vorhanden sind, kann man in diesem Test nur die maximal aktivierbare Menge des FSF bestimmen, so daß man nicht zwischen inaktivem und aktivem Faktor unterscheiden kann. Man wird also Aktivitätserhöhungen in der beschriebenen Testanordnung nicht messen können. Veränderungen der FSF-Aktivität werden sich demgemäß nur in einer Erniedrigung bemerkbar machen.

2) Einfluß der Streptokinase auf das Testsystem

Benutzt man den FSF-Test für in vitro Versuche, muß man nach den vorhergehenden Überlegungen zuerst sicherstellen, daß die im Testsystem zusätzlich angewandten Substanzen keine artifiziellen FSF-Aktivitätsverschiebungen hervorrufen, wobei besonders auf

die Beeinflussung der Gerinnungsfähigkeit des Testfibrinogens zu achten ist.

Die Streptokinase selbst verändert die Polymerisationsverhältnisse des Testfibrinogens nicht, was zusätzlich nachweist, daß das Testfibrinogen plasminogenfrei ist, da es auch nach längerer Inkubationszeit bis zu zwei Tagen nicht zur Proteolyse des Gerinnsels kommt.

3) Einfluß der Antifibrinolytica auf den Faktor XIII und die Gerinnungsfähigkeit des Testfibrinogens

Wichtig ist bei diesen Experimenten das Verhalten des FSF und des Fibrinogens zu untersuchen, wenn man dem zu untersuchenden Plasma oder dem Testsystem direkt ein Antifibrinolyticum zusetzt, das natürlich, wenn es für die beschriebene Methode zur Inaktivierung der Fibrinolyse geeignet sein soll, weder das Testfibrinogen noch den FSF selbst beeinflussen darf.

a) AMCHA

Setzt man AMCHA dem Plasma direkt zu, kommt es zu keiner Verschiebung der FSF-Aktivität, so daß AMCHA keinen direkten Einfluß auf den Faktor XIII und dessen Aktivierung hat. Wird AMCHA demgegenüber dem Testsystem direkt zugesetzt, so daß es in wesentlich höherer Konzentration auf das Testfibrinogen wirkt, kommt es zu Veränderungen der ermittelten FSF-Aktivität und der Qualität der beim Test entstandenen Gerinnsel, die umso durchscheinender werden, je mehr AMCHA im Testgemisch vorhanden ist. Es kann infolgedessen zu artifiziellen Faktor XIII-Erhöhungen kommen, da durch die beschriebenen Veränderungen am Gerinnsel eine Verlängerung der Lösungszeit zu beobachten ist.

AMCHA führt außerdem zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit, die einmal durch eine Veränderung am Thrombin, zum anderen durch eine Veränderung am Fibrinogen erklärt werden kann. Dieser Befund erinnert an die von ABILDGAARD und KORSAN-BENGTSEN hervorgerufene Verlängerung der Thrombingerinnungszeit durch Zusatz von hochmolekularen Säuren (1, 50). ABILDGAARD konnte zeigen, daß organische Säuren von der Ameisensäure bis zur Buttersäure eine Verkürzung der Thrombinzeit gegenüber physiologischer Kochsalzlösung, von der Valeriansäure über die Capronsäure aufwärts eine Verlängerung der Thrombinzeit verursachen (1). Nach KORSAN-BENGTSEN haben diese langkettigen Säuren einen Effekt sowohl auf Thrombin, der irreversibel ist, als auch auf Fibrinogen (50). Außerdem kommt es durch hochmolekulare, nicht ionisierte Substanzen zu einer veränderten Fibrinbildung. Die Gerinnsel werden elastischer, damit auch weniger löslich, und bestehen aus dicken Fibrillen (26).

Ähnliche Effekte sind auch von Epsilon-Aminocapronsäure beschrieben worden, die genau wie AMCHA von ihrer molekularen Struktur den langkettigen Säuren ähnelt. Hier wird von einer veränderten Fibrinbildung (24) und von einer Hemmung der Retraktion berichtet (30).

Die Verlängerung der Lösungszeit der mit AMCHA versetzten Gerinnsel scheint also durch unspezifische Effekte am Thrombin und am Fibrinogen aufzutreten. Es kommt dabei zu einer Denaturierung des Fibrins mit anschließender festerer Zusammenlagerung der veränderten Fibrinmoleküle. Diese Veränderungen im FSF-Test durch AMCHA haben aber keinerlei praktische Bedeutung. Die bei einer Behandlung mit dem Antifibrinolyticum vorliegende Plasmakonzentration liegt weit unter der Konzentration, die dem Plasma oder dem Testsystem bei diesen Versuchen zugesetzt wurden, so daß unter einer antifibrinolytischen Therapie mit AMCHA artifizielle Verschiebungen der FSF-Bestimmung nicht zu erwarten sind.

b) Trasylol

Im Gegensatz zu AMCHA hat Trasylol weder als Plasmazusatz noch als Zusatz zum Testsystem einen Einfluß auf die FSF-Aktivität und deren Bestimmungsmethode ausgeübt. Trasylol hat demnach keinen hemmenden Einfluß auf den Faktor XIII, der sich hierin vom Faktor VIII unterscheidet (11). Da Trasylol keine Veränderungen am Testfibrinogen hervorruft, auch keinen Einfluß auf die Thrombinaktivität ausübt (11) und zudem, wie schon beschrieben im Gegensatz zu AMCHA alle Schritte einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems unterbricht, ist Trasylol das ideale Antifibrinolyticum für diese Versuchsbedingungen.

4) Einfluß der Fibrinogenspaltprodukte auf den Faktor XIII und die Fibrinpolymerisation

Bei den bisher diskutierten Untersuchungen zeigt sich, daß im Plasma vorhandene Substanzen, die eventuell einen Einfluß auf die Fibrinbildung haben könnten, durch die sehr hohe Plasma-verdünnung im Testsystem die Gerinnungsfähigkeit des Testfibrinogens nicht beeinflussen können, wodurch sich der Test durch eine sehr hohe Spezifität auszeichnet. Der bei den Fibrinolyseversuchen am frischen Plasma gefundene Aktivitätsverlust des FSF kommt schon bei derjenigen Streptokinasekonzentration zustande, bei der mit den verwendeten Methoden "splits" noch nicht nachgewiesen werden können.

Erst nachdem bei 40 E Streptokinase pro ml Plasma der FSF-Aktivitätsverlust beendet ist, kommt es zu einem mit der Fibrinolyseaktivität steigendem Gehalt an Fibrinogenspaltprodukten im Plasma, ohne daß weitere Veränderungen der FSF-Aktivität auftreten.

Die Polymerisationseigenschaften des Testfibrinogens bleiben demnach durch die Zunahme der Spaltprodukte unbeeinflusst. Auch der Befund, nach dem bei den im Test verwendeten Plasmaverdünnungen von total lysiertem Plasma eine Veränderung der Thrombingerinnungszeit des Testfibrinogens nicht auftritt, zeigt, daß die "splits" auf die FSF-Bestimmung keinen Einfluß haben.

Nach dem vorliegenden Befund haben die Spaltprodukte auch keinen Einfluß auf die FSF-Aktivität selbst, weil sonst der Aktivitätsverlust im lysierten Plasma am höchsten sein müßte. Die Höhe der FSF-Aktivität selbst im total lysiertem Plasma ist immer noch voll ausreichend, ein normales Gerinnsel zu stabilisieren. Daß es dennoch im lysierten Plasma zu Polymerisationsstörungen kommt, liegt an der Unfähigkeit des FSF, durch den Einbau von "splits" defekte monomere Gerinnsel teilweise oder vollständig zu stabilisieren.

Die Spaltprodukte haben demgemäß keinen echten Antithrombin-effekt. Sie hemmen aber die Polymerisation dadurch, daß sie die monomeren Gerinnsel so verändern, daß sie für den FSF falsches Substrat darstellen.

5) Direkter Einfluß der Streptokinase induzierten Fibrinolyse auf die Aktivität des Faktor XIII

Die Fibrinogenspaltprodukte können nach den vorliegenden Befunden den initialen Aktivitätsverlust des FSF nicht verursachen. Es ist deshalb zu überlegen, ob dieser Aktivitätsverlust auf einem direkten Einfluß von Plasmin im Sinne einer Proteolyse gedeutet werden kann.

Käme es zu einer Andauung des Faktors durch Plasmin, müßte ein kontinuierlicher Abfall seiner Aktivität auftreten, je mehr Streptokinase dem Plasma zugesetzt wird und je länger die Inkubationszeit ist. Bei hohen Dosen des Fibrinolyticums müßte es zu einem nahezu völligen Verschwinden der FSF-Aktivität

kommen. Der Aktivitätsverlust müßte unter solchen Bedingungen parallel zum Fibrinogenabfall verlaufen. Daß der Faktor XIII bei hohen Konzentrationen konstant bleibt, spricht gegen eine Proteolyse des Faktors. Diese Auffassung wird noch durch die Befunde mit Hämophilie-A-Plasma unterstrichen, wo es trotz normal induzierbarer Fibrinolyse zu keinem Aktivitätsverlust des FSF kommt. Wäre der FSF-Verlust von der Fibrinolyse allein abhängig, müßte er genauso wie bei Normalplasma auftreten.

Bei den Untersuchungen mit dem gelagerten Plasma müßte der FSF-Verlust, der sich mit zunehmender Lagerung nicht mehr reproduzieren ließ, auch beim gealterten Plasma auftreten, da sich die Fibrinolyse normal induzieren ließ. Zudem ist bei hohen Streptasedosen (500 - 1000 E/ml Plasma) der Aktivitätsverlust nicht so ausgedehnt wie bei niedrigeren Dosierungen. Wenn aber der Aktivitätsverlust von der Proteolyse des Faktors abhängig wäre, müßten die Verhältnisse gerade umgekehrt sein. Der Aktivitätsverlust des FSF muß also durch einen komplizierteren Mechanismus ausgelöst werden, als nur durch die Proteolyse des Faktors.

6) Verhalten der Faktoren VIII und V bei Streptokinase induzierter Fibrinolyse

Das Verhalten des FSF bei Hämophilie-A-Patienten, bei deren Plasma unter der Fibrinolyse der initiale FSF-Verlust nicht eintritt, deutet daraufhin, daß der Faktor VIII bei der Ursache dieses FSF-Verlustes eine Rolle spielt. Hinzu kommt, daß sich wegen dem schon beschriebenen fibrinogenähnlichen Verhalten der Faktoren V, VIII und XIII ein Vergleich dieser Faktoren unter dem Einfluß der Fibrinolyse anbietet. Die Untersuchungen der Faktoren V und VIII wurden nach dem gleichen Muster wie die Faktor XIII Untersuchungen durchgeführt.

Nach einem Aktivitätsanstieg des Faktor VIII bis zu 40 E Streptokinase pro ml Plasma, also in der Phase der Fibrinolyse, bei der es noch nicht zu erkennbaren Änderungen der Thrombingerinnungszeit und des Fibrinogenspiegels gekommen ist, stellt sich ein excessiver Verlust der Faktor VIII Aktivität ein, so daß bei hohen Streptokinasedosen kaum noch eine Aktivität nachweisbar ist.

Auffallend ist bei diesen Versuchen das gegensätzliche Verhalten der Faktor VIII und XIII Aktivitäten zu Beginn der Fibrinolyseaktivierung.

Um die Befunde über die Faktor VIII Aktivität erklären zu können, muß man zunächst die Spezifität des verwendeten Testes beurteilen.

Es ist durchaus vorstellbar, daß durch die Fibrinogenspaltprodukte, die durch das zu untersuchende fibrinolytierte Plasma dem Testsystem zugesetzt werden, eine Verlängerung der Gerinnungszeit auftritt, weil die Gerinnungsfähigkeit des Testsystems von der Gerinnbarkeit des im Hämophilie-A-Plasma und im zu untersuchenden Plasma vorhandenen Fibrinogen abhängig ist.

Für diese Annahme spricht, daß die Gerinnungszeiten von derjenigen Streptokinasekonzentration ab verlängert sind, bei der es zur ersten Thrombinzeitverlängerung kommt. Auch die Befunde von JUNG und DUCKERT (41) zeigen diese auffallende Parallelität des Faktor VIII Abfalls und des Fibrinogens. Sie sehen in diesem Befund die Proteolyse des Faktors unter Plasmineinwirkung.

Ob es sich bei dem Abfall der Faktor VIII Aktivität tatsächlich um eine Andauung des Faktors handelt, oder ob dieser Abfall durch die dem Testsystem zugesetzten Spaltprodukte zustandekommt, demzufolge als unspezifisch bezeichnet werden müßte, kann man nach den vorliegenden Befunden nicht entscheiden. Die Probleme, die bei der Bestimmung des Faktor VIII auftreten, gelten in gleicher Weise auch für die verwendete

Faktor V-Methode. Auch hier ist sehr schwer zu differenzieren, ob die Fibrinogenspaltprodukte den bestimmten Aktivitätsverlust verursachen oder ob auch hier eine Proteolyse des Faktors vorliegt.

7) Thrombinentstehung durch die Fibrinolyse

Nach den bisherigen Untersuchungen werden bei der Fibrinolyse jene Faktoren - die Faktoren V, VIII und XIII - in ihrer Aktivität verändert, die auch durch das Auftreten von Thrombin ihre Aktivität ändern. Über eine Aktivierung des FSF durch Thrombin wäre der FSF-Abfall wesentlich besser zu erklären, als durch die Andauung des Faktors, zumal die Inkubation mit Thrombinspuren ebenfalls einen Verlust der Faktor XIII Aktivität verursacht, entsprechend dem von BULUK (13) und LORAND und KONISHI (67) beschriebenen Phänomen, nach dem aktivierter Faktor XIII nach seiner Aktivierung nicht mehr nachzuweisen ist. Eine Thrombinentstehung würde ebenfalls die Steigerung der Faktor VIII Aktivität gut erklären. Nach der Testanordnung der verwendeten Faktor VIII Bestimmung kann natürlich auch eine vom Faktor VIII unabhängige Thrombinentstehung eine Verkürzung der Gerinnungszeit verursachen, so daß auf diese Art nicht unbedingt eine Zunahme der Faktor VIII Aktivität ausgedrückt wird. Es muß aber, wenn Thrombin entstanden ist, mindestens zu einer sekundären Faktor VIII Aktivierung kommen, wenn man die Befunde von OZGE-ANWAR . (84) in Rechnung stellt, der das zugesetzte Thrombin nach seiner Wirkung mit Hilfe von DFP (Diisopropylfluorophosphat) inaktiviert hat, und trotzdem eine Aktivitätszunahme des Faktors gemessen hat. Die Befunde über den Faktor VIII deuten genauso wie die FSF-Befunde auf eine Thrombinentstehung durch die induzierte Fibrinolyse hin.

Für eine Aktivierung des Gerinnungssystems durch die Fibrinolyse sprechen neben den Aktivitätszunahmen der Faktoren V, VIII und

XIII die Abnahme der Recalcifizierungszeit des Plasmas (5, 10) und die von AMRIS gemessene gesteigerte Thrombinbildung (5) in einer Phase der Fibrinolyse, bei der es noch nicht zu nachweisbaren Veränderungen des Fibrinogens gekommen ist.

AMRIS konnte ebenfalls in vivo bei beginnender Plasminbehandlung eine Hyperkoagulabilität beobachten (5). Zu Beginn der Fibrinolyse muß trotzdem schon Plasmin vorhandensein. FLETCHER et al. (28) konnten zeigen, daß bei etwa 20 E Streptokinase pro ml Plasma das Plasminogen zwar schon um fast die Hälfte reduziert ist, aber dennoch keine wesentliche Abnahme des Fibrinogens oder Zunahme der Thrombinzeit festzustellen ist.

Eine Thrombinentstehung unter der Fibrinolyse würde eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den nach einer kurzen Aktivierungsphase auftretenden excessiven Faktor VIII Aktivitätsverlust anbieten. Der Faktor VIII ist im Serum mit den üblichen Methoden nicht mehr nachweisbar. SEEGERs und MAMMEN konnten nach Ätherbehandlung von Normalserum die volle Faktor VIII Aktivität, gemessen am Prothrombinverbrauch, wiederherstellen (39, 40, 77, 91). Sie machen für die Inaktivierung des Faktor VIII ein aus der Ätherfraktion isoliertes Lipoproteid, Inhibitor Source Material genannt, verantwortlich, das durch Thrombin aktiviert wird und mit dem Faktor VIII einen inaktiven Komplex bildet. MAMMEN konnte sogar den Faktor VIII nach Ätherbehandlung aus dem Serum reinigen (71, 72, 74, 75). Thrombin ist demgemäß für den Faktor VIII-Abfall während der Gerinnung verantwortlich (85). Entstände in der Vorphase der Fibrinolyse Thrombin, so könnte das zu einer Aktivierung des Inhibitor Source Materials führen, das dann den Faktor VIII inaktivieren würde, so daß im lysierten Plasma die Faktor VIII Aktivität auf Serumwerte absinken kann.

All diese beschriebenen Befunde geben aber keinen sicheren Aufschluß darüber, auf welche Weise die Hyperkoagulabilität zu Beginn der Fibrinolyse zu erklären ist, da der direkte An-

griffspunkt des Plasmin oder auch der Fibrinogenspaltprodukte in der Vorphase oder der ersten Phase der Gerinnung nicht bekannt ist.

In diesem Zusammenhang sind zwei Möglichkeiten zu diskutieren.

- a) Eine Umwandlung von Prethrombin zu Thrombin über Plasmin ist denkbar.

Prethrombin kann mit Hilfe von Trypsin zu Thrombin umgewandelt werden (95, 96). Dafür spricht außerdem, daß Sojabohmentrypsininhibitor in der Lage ist, die Wirkung von Autoprothrombin C, das normalerweise die Umwandlung des Prethrombin verursacht, zu hemmen (2).

Nach FLETCHER entfalten, wenigstens bei der Fibrinogenolyse Plasmin und Trypsin gleiche Wirkung (28). Es ist deshalb durchaus vorstellbar, daß eine Umwandlung des Prethrombin zu Thrombin nicht nur durch Trypsin, sondern auch durch Plasmin zustandekommen kann.

Das auf diese Art entstandene Thrombin wäre dann in der Lage den Faktor VIII und den Faktor XIII zu aktivieren, wobei eine Faktor VIII Aktivierung eine erneute Thrombinentstehung zur Folge hätte.

Das Ausbleiben der Faktor XIII Aktivierung unter der Fibrinolyse bei Hämophilie-A-Plasma kann unter diesen Voraussetzungen zwei verschiedene Ursachen haben.

1. Der Faktor VIII besitzt größere Affinität zu Thrombin als der Faktor XIII. Das bei der Umwandlung aus Prethrombin entstehende Thrombin reicht nur für eine Faktor VIII Aktivierung aus, erst über diesen Feedback-Mechanismus kommt es durch den Faktor VIII zu einer Steigerung der Thrombinbildung, die dann für eine Faktor XIII Aktivierung ausreicht. Bei Hämophilie-A-Plasma kann dieser Feedback-Mechanismus nicht zustandekommen, deshalb bleibt die Faktor XIII Aktivierung aus.

2. MAMMEN konnte zeigen, daß für den Hämophilie-A-Gerinnungsdefekt ein atypisches Lipoproteid verantwortlich ist, das eine Hemmung der Thrombinbildung des Intrinsic-Systems zur Folge hat (73, 76). Infolgedessen könnte es auch nicht zu einer weiteren Thrombinbildung bei Hämophilie-A-Plasma kommen, die ausreicht, den FSF zu aktivieren.

b) Nach TRIANTOPHYLLOPOULOS kann ein verminderter Prothrombinverbrauch durch Zusatz von Fibrinogenspaltprodukten vom MG 80 000, korrigiert werden, deren Wirkung als Faktor VIII ähnlich zu bezeichnen wäre (102). Auf diese Art wäre es vorstellbar, daß es zu einer Thrombinentstehung durch diese "splits" kommen kann. Das würde aber nach unseren Versuchsergebnissen bedeuten, daß schon bei 20 und 40 E Streptokinase pro ml Plasma für diese Plättchencofaktor I ähnliche Wirkung genügend Spaltprodukte vorhanden sein müßten, obwohl es bei diesen Streptokinasekonzentrationen noch nicht zu Veränderungen der Fibrinogenkonzentration und der Thrombingerinnungszeit gekommen ist.

Bei hohen Streptokinasekonzentrationen wäre dann aber zu fordern, daß durch die gesteigerte Konzentration der Spaltprodukte eine weitere Steigerung der Thrombinbildung und damit auch der FSF-Aktivierung auftritt, was sich in einem zunehmenden FSF-Aktivitätsverlust zeigen würde, der parallel zur Bildung der Spaltprodukte verlaufen und im vollkommen lysierten Plasma am höchsten sein müßte.

Legt man diese Theorie trotz dieser Einwände für die Thrombinbildung zugrunde, so erklärt wiederum die Auffassung von MAMMEN, wonach es bei Hämophilie-A-Plasma durch ein atypisches Lipoproteid zu einer Hemmung der gesamten Thrombinbildung des Intrinsic System kommt (73), das Ausbleiben der Faktor XIII Aktivierung unter der Fibrinolyse bei Hämophilie-A-Plasma.

Bei gelagertem Poolplasma kommt die Aktivierung des fibrin-stabilisierenden Faktors durch die Fibrinolyse nicht zustande. Wie eingangs in der Diskussion erwähnt, muß bei dem gemessenen Aktivitätsverlust ein komplizierterer Mechanismus zugrunde liegen, als nur die Proteolyse des FSF.

Die Faktor VIII-Aktivität wird zum Beispiel durch Einfrieren und Auftauen um mindestens 25 % vermindert (12, 86). Da ein Teil des gepoolten Plasmas sogar zweimal eingefroren war, resultiert daraus sicherlich ein noch höherer Faktor VIII Verlust. Im eingefrorenen Zustand soll die Faktor VIII Aktivität dann relativ konstant bleiben (18, 86).

Die Faktor V Aktivität, nötig für die Aktivierung des Prothrombin (16), scheint durch die Prozedur des Einfrierens und Lagerns noch mehr in Mitleidenschaft gezogen zu werden (35, 43). Dadurch ist leicht zu erklären, daß ein komplizierter Aktivierungsmechanismus durch reduzierte Aktivierungsmöglichkeiten durch Mangel an Faktoren V und VIII nicht mehr richtig zustandekommen kann.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Ergebnisse über das Verhalten des FSF unter der Fibrinolyse eine Erklärung für das bei Beginn der Fibrinolyse auftretende Phänomen der Hyperkoagulabilität gebracht haben. Die Befunde zeigen eindeutig, daß es unter der Fibrinolyse zu einer Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin kommt, ohne daß nach den vorliegenden Ergebnissen gesagt werden kann, auf welchem Weg diese Umwandlung abläuft.

8) Unabhängiges Verhalten des FSF vom Fibrinogen unter der Fibrinolyse

Diese Untersuchungen bringen nicht nur Hinweise für die Erklärung der sowohl in vitro als auch in vivo beobachteten Hyperkoagulabilität unter einer beginnenden Fibrinolyse. Sie zeigen auch, inwieweit der Faktor XIII den anderen Gerinnungsfaktoren ähnelt. Die vielen fibrinogenähnlichen Eigenschaften legten die Vermutung nahe, daß sich der Faktor XIII auch unter der Fibrinolyse fibrinogenähnlich verhält. Aber gerade die Fibrinolyseversuche zeigen, daß die Aktivität des FSF in keiner Weise von der Konzentration und dem Funktionszustand des im Plasma vorhandenen Fibrinogens abhängig ist. Die Eigenständigkeit des FSF wird noch dadurch unterstrichen, daß der Faktor XIII genau wie der Faktor VIII bei Afibrinogenämie normal nachweisbar ist (34, 46).

Der FSF verhält sich unter der Fibrinolyse anders als der Faktor VIII, insofern man über das Verhalten des Faktor VIII trotz der schon beschriebenen methodischen Unzulänglichkeiten etwas aussagen kann.

Die mit Streptokinase durchgeführten in vitro Untersuchungen lassen sich, wie FLETCHER festgestellt hat, gut auf in vivo Verhältnisse übertragen (29).

Die FSF-Untersuchungen von MÜNCH an mit Streptokinase behandelten Patienten ergaben im wesentlichen genau die gleichen Befunde wie die in vitro Experimente (82). Die von DUCKERT und SIGG veröffentlichten Angaben, daß unter einer therapeutischen Fibrinolyse ein vollkommenes Verschwinden des FSF zu beobachten wäre (23), lassen sich also in keiner Weise bestätigen. Diese FSF-Bestimmungen wurden mit dem MIA-Toleranz-Test nach SIGG (100, 101) durchgeführt. Diese Testanordnung ist sehr von der

Fibrinogenkonzentration des zu untersuchenden Plasma abhängig, so daß ein Fibrinogenabfall oder das Auftreten von Fibrinogenspaltprodukten im Testplasma einen FSF-Abfall vortäuschen können. MÜNCH konnte außerdem zeigen, daß sich bei den erworbenen Gerinnungsstörungen sowohl bei den Bildungsstörungen als auch bei den Umsatzstörungen ein fibrinogenunabhängiges Verhalten des FSF nachweisen läßt (82).

Diese Auffassung wird auch von KÖRTING bestätigt, der beim experimentellen Schwartzman-Sanarelli-Phänomen ein fibrinogenähnliches Verhalten des FSF nur bedingt zeigen konnte. Es kommt zwar zu einem parallelen Abfall von FSF und Fibrinogen nach der ersten und zweiten Endotoxin Injektion, das Fibrinogen steigt nach der zweiten Injektion aber wieder wesentlich schneller an als die Faktor XIII Aktivität (51).

All diese Befunde zeigen, daß der fibrinstabilisierende Faktor trotz seiner offensichtlichen Komplexbildung mit dem Fibrinogen ein vollkommen eigenständiger Faktor ist, der sich mit dem FSF-Test nach HEENE et al. sehr gut unbeeinflusst von den anderen Faktoren des Gerinnungssystems bestimmen läßt und der deshalb auch für die klinische Diagnostik der Gerinnungsstörungen von Bedeutung sein wird.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Verhalten des Faktor XIII in vitro unter der durch Streptokinase induzierten Fibrinolyse untersucht. Dabei wurden vergleichende Untersuchungen mit den ebenfalls fibrinogen-ähnlichen Faktor V und VIII angestellt. Für die Experimente wurde der FSF-Test nach HEENE (36) benutzt, der sich nach den Voruntersuchungen durch seine hohe Spezifität auszeichnet.

Bei den Ansätzen mit frischem Plasma wurde mit verschiedenen Streptokinasekonzentrationen von 20 E bis 1000 E pro ml Plasma eine Fibrinolyse induziert, deren Intensität mit Hilfe der Thrombingerinnungszeit und des Fibrinogenspiegels bestimmt wurde.

Bei Streptokinasekonzentrationen bis zu 40 E pro ml Plasma kam es zu einem geringen, aber signifikanten Aktivitätsverlust des Faktor XIII; danach blieb die Aktivität unabhängig vom Ausmaß der Fibrinolyse konstant. Der initiale Verlust an FSF unter der Fibrinolyse ließ sich bei gealtertem Poolplasma und frischem Hämophilie-A-Plasma nicht reproduzieren.

Durch Vorinkubation von frischem Plasma mit Thrombinspuren kam es in etwa zu dem gleichen Aktivitätsverlust des FSF wie unter der Fibrinolyse, so daß sich auch eine Aktivierung des Faktors durch eine Aktivitätsverminderung im FSF-Test bemerkbar macht.

Die Faktoren V und VIII wurden bei Streptokinasekonzentrationen bis zu 40 E pro ml Plasma aktiviert, danach kam es entsprechend dem Ausmaß der induzierten Fibrinolyse zu einem excessiven Aktivitätsverlust dieser beiden Faktoren, der nach den benutzten Testsystemen nicht sicher zu beurteilen ist. Er kann einmal durch die Proteolyse der beiden Faktoren, aber auch durch das Auftreten von Fibrinogenspaltprodukten im Testsystem verursacht sein.

Das Verhalten der Faktoren V, VIII und XIII zu Beginn der Fibrinolyse bei Streptokinasekonzentrationen bis zu 40 E pro ml Plasma ist auch in Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren nur durch eine Thrombinentstehung durch die Fibrinolyse zu erklären. Möglichkeiten der Thrombinbildung durch Plasmin wurden diskutiert.

Die bei der Fibrinolyse auftretenden Spaltprodukte des Fibrinogens haben auf den Faktor XIII keinen Einfluß. Die unter der Fibrinolyse auftretende Polymerisationsstörung ist nur dadurch zu erklären, daß der ausreichend vorhandene FSF die durch den Einbau von Fibrinogenspaltprodukten defekten monomeren Gerinnssel nicht polymerisieren kann. Die Wirkung der hochmolekularen Spaltprodukte besteht also nicht in einer Antithrombinwirkung im engeren Sinne, sondern in einer Antipolymerasewirkung. Die Untersuchungen ergaben, daß der FSF trotz seiner vielen fibrinogenähnlichen Eigenschaften und seiner Komplexbindung mit dem Fibrinogen sich unter der Fibrinolyse vollkommen unabhängig vom Fibrinogen verhält, wodurch seine Eigenständigkeit unterstrichen wird.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABILDGAARD, U.: Acceleration of Fibrinpolymerisation by Acetate and other low molecular ions. Scand.J.clin.Lab.Invest. 16, 521 (1964)
2. ALKJAERSIG, N., E. DEUTSCH u. W.H. SEEGER: Prothrombin derivates and the inhibition of thrombin formation with Soy Bean Trypsin Inhibitor. Amer.J.Physiol. 180, 367 (1955)
3. ALKJAERSIG, N., A.P. FLETCHER u. S. SHERRY: Pathogenesis of coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic (fibrinolytic) states. (II. Significance, mechanism and consequences of defective fibrinpolymerisation). J.clin.Invest. 41, 917 (1962)
4. AMRIS, C.J.: Inhibition of fibrinolytic and thromboplastic activity by Trasylol. Scand.J.Haemat. 3, 19 (1966)
5. AMRIS, C.J.: Investigations concerning activator-free porcine plasmin. Scand.J.clin.Lab.Invest. 18, Suppl. 89, 1 (1966)
6. AMRIS, C.J. u. L. RANEK: A case of fibrin-stabilizing factor (FSF) deficiency. Thrombos.Diathes. haemorrh. 14, 332 (1965)
7. ANDERSSON, L., I.M. NILSSON, J.E. NIHLÉN, U. HEDNER, B. GRANSTRAND u. B. MELANDER: Experimental and clinical studies on AMCHA, the antifibrinolytically active isomer of p-amino-methyl cyclo-hexane carboxylid acid. Scand.J. Haemat. 2, 230 (1965)
8. BANG, N.U., A.P. FLETCHER, N. ALKJAERSIG u. S. SHERRY: Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic (fibrinolytic) states. III. Demonstration of abnormal clot structure by electron microscopy. J.clin.Invest. 41, 935 (1962)
9. BARKAN, G. u. A. GASPAR: Zur Frage der Reversibilität der Blutgerinnung. Biochem. Z. 139, 291 (1923)
10. BELLER, F.K. u. P. GLAS: The activation of plasminogen by urokinase (in comparison with previous observations made with streptokinase). Thrombos. Diathes. haemorrh. 2, 531 (1961)

11. BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK u. P.I. OLSSON: Action of a proteolytic enzyme inhibitor on blood coagulation in vitro. Neue Aspekte der Trasyloltherapie: Berichte über ein Internationales Symposium in Große Ledder am 29.3. u. 30.3. 1965, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart; 33.
12. BRITTEN, A. u. M. GROVE-RASMUSSEN: Stability of factor VIII in the frozen state. Transfusion 6, 230 (1966)
13. BULUK, K., T. JANUSZKO u. J. OLBROMSKI: Conversion of fibrin and desmofibrin. Nature (London) 191, 1093 (1961)
14. BULUK, K., J. OLBROMSKI, T. JANUSZKO u. A. ZUCH: Desmofibrin formation and the activity of the Fibrin-Stabilizing Factor during the cleavage of its SH-groups by Thrombin. Thrombos. Diathes.haemorrh. 16, 51 (1966)
15. CHANDRASEKHAR, N., A. OSBAHR u. K. LAKI: The mode of action of the Laki-Lorand-Factor in the clotting of fibrinogen. Biochem.biophys.Res.Commun. 15, 182 (1964)
16. COLE, E.K., J.L. KOPPEL u. J.H. OLWIN: Phospholipid-protein interaction in the formation of prothrombin activator. Thrombos.Diathes.haemorrh. 14, 431 (1965).
17. COON, W.A. u. I.V. DUFF: Effect of intravenous human plasmin on the blood clotting mechanism of the dog. J.Lab.clin.Med. 51, 381 (1958)
18. COWAN, D.H.: Factor VIII-Chemistry. The physiologic basis of therapy of classic Hemophilia (F VIII-deficiency) and related disorders. Combined clinical staff conference at the National Institute of Health Bethesda. Ann.Intern.Med. 67, 861 (1967)
19. DUBBER, A.H.C., G.P. McNICOL u. A.S. DOUGLAS: Amino-methyl cyclohexane carboxylic acid (AMCHA), a new synthetic fibrinolytic inhibitor. Brit. J. Haemat. 11, 237 (1965)
20. DEUTSCH, E. in GROSS, R. u. D. JAHN: Lehrbuch der Inneren Medizin. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1966, 215
21. DONALDSON, V.H.: Effect of plasmin in vitro on the clotting factors in plasma. J.Lab.clin.Med. 56, 644 (1960)

22. DUCKERT, F., E. JUNG u. D.H. SHMERLING: A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis, probably due to Fibrin-Stabilizing Factor. *Thrombos.Diathes.haemorrh.* 5, 179 (1960)
23. DUCKERT, F. u. P. SIGG: The Fibrin-Stabilizing Factor (Factor XIII). *Proc. 9th congr.europ.Soc. Haemat. Lisbon 1963*. S. Karger Verlag Basel/New York 1963, 1250
24. EGEBALD, K.: Effects of epsilon-amino-caproic acid on fibrin clot lysis. *Thrombos.Diathes.haemorrh.* 15, 173 (1966)
25. FENSKE, G.: Dissertation (1968)
26. FERRY, J.D. u. P.R. MORRISON: Preparation and properties of serum and plasma proteins. VIII. The conversion of human fibrinogen to fibrin under various conditions. *J.Amer.chem.Soc.* 69, 1, 388 (1947)
27. FLETCHER, A.P., N. ALKJAERSIG, S. FISHER u. S. SHERRY: The proteolysis of fibrinogen by plasmin: the identification of thrombin-clottable-fibrinogenderivates which polymerise abnormally. *J.Lab.clin.Med.* 68, 780 (1966)
28. FLETCHER, A.P., N. ALKJAERSIG u. S. SHERRY: Pathogenesis of coagulation defect developing during pathological plasma (fibrinolytic) states. I. Significance of fibrinogen proteolysis and circulating fibrinogen breakdown products. *J.clin.Invest.* 41, 896 (1962)
29. FLETCHER, A.P., S. SHERRY u. M. ALKJAERSIG: The maintenance of the sustained thrombolytic state in man. *J.clin.Invest.* 38, 1096 (1959)
30. FONIO, A.: Diskussionsbemerkung. *Schweiz.med.Wschr.* 92, 1370 (1962)
31. FREUDENBERG, K.: Grundriß der medizinischen Statistik. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1962
32. HABERLAND, G.L. u. P. MATIS: Trasylol, ein Proteaseninhibitor bei chirurgischen und internen Indikationen. *Med.Welt (N.F.)* 18, 1367 (1967)
33. HARDISTY, R.M. u. J.C. MCPHERSON: A one stage Factor VIII (Antihaemophilic Globulin) assay and its use on venous and capillary plasma. With a note on the calculation of confidence limits by G.F.C. INGRAM. *Thrombos.Diathes.haemorrh.* 7, 215 (1962)

34. HARDISTY, R.M. u. J.L. PINNINGER: Congenital afibrinogen-
aemie further observations on the blood
coagulation mechanism. Brit.J.Haemat.
2, 139 (1956)
35. HARMISON, CH.R. u. E.F. MAMMEN: Molecular characteristics
of substances active in blood clotting.
Blood Clotting Enzymology, Academic Press,
New York/London 1967, 24
36. HEENE, D.L.: Diskussionsbemerkung. Fibrinstabilisierender
Faktor, Struktur des Blutgerinnsels, Krebs
und Blutgerinnung. F.K. Schattauer Verlag,
Stuttgart 1968, 33
37. HEKMA, E.: Über das Fibrin und seine Beziehung zu einigen
Fragen der Biologie und Kolloidchemie.
Mit besonderer Berücksichtigung des Blut-
gerinnungsproblems. Biochem.Z. 65, 311
(1914)
38. IKKALA, E. u. H. NEVANLIUNA: Congenital deficiency of fibrin-
stabilizing factor. Thrombos.Diathes.
haemorrh. 7, 567 (1962)
39. JOHNSON, S.A., R. McCHLAUGHRY u. W.H. SEEGERs: Nature of
the blood clotting mechanism in Hemophilia.
J.Mich.med.Soc. 54, 797 (1955)
40. JOHNSON, S.A. u. W.H. SEEGERs: Studies on the plasma defect
in Hemophilia. Rev. Hemat. 2, 529 (1954)
41. JUNG, E. u. F. DUCKERT: Wirkung von Plasmin (Fibrinolysin)
auf die Gerinnungsfaktoren. Schweiz.med.
Wschr. 90, 1239 (1960)
42. JÜRGENS, J.: Über das Verhalten antithrombischer Substanzen
bei Erkrankungen der Leber. Dt.Arch.Klin.
Med. 200, 67 (1952)
43. JÜRGENS, J. u. F.K. BELLER: Klinische Methoden der Blut-
gerinnungsanalyse. Georg Thieme Verlag,
Stuttgart 1959
44. KASELL, B., M. RADICEVIC, M.J. ANSFIELD u. M.sr.LASKOWSKI:
The basic trypsin inhibitor of bovine
pancreas. IV. The linear sequeance of the
58 amino acids. Biochem.biophys.Res.Commun.
18, 255 (1965)
45. KAZAL, L.A., S. AMSEL, O.P. MILLER u. L.M. TOCANTINS: The
preparation and some properties of fibrino-
gen precipitated from human plasma. Proc.
Soc.exp.Biol. 113, 989 (1963)
46. KIESELBACH, T.H. u. R.H. WAGNER: Fibrin-Stabilizing Factor,
a thrombin labile platelet protein. Amer.
J.Physiol. 211, 1472 (1966)

47. KIESSELBACH, T.H. u. F.H. WAGNER: Platelet and plasma factor XIII (Fibrin-Stabilizing Factor). *Thrombos. Diathes.haemorrh. Suppl.* 26, 155 (1967)
48. KOLLER, F.: Intravascular clotting and spontaneous fibrinolysis. *Proc. 9th congr.europ.Haemat.Lisbon 1963*. S. Karger Verlag, Basel/New York 1963, 111
49. KOPÉČ, M., E. KOWALSKI u. J. STACHURSKA: Studies on para-coagulation. Role of antithrombin VI. *Thrombos.Diathes.haemorrh.* 5, 285 (1961)
50. KORSAN-BENGTSSEN, K.: Influence of anions and cations with a long hydrocarbon chain on the thrombin-fibrinogen relation. *Scand.J.clin.Lab. Invest.* 12, Suppl. 45 (1960)
51. KÖRTING, A.: Dissertation (1968)
52. LAKI, K. u. N. CHANDRASEKHAR: Salic-acid in fibrinogen and vulcanization of the fibrin-clot. *Nature (London)* 197, 1267 (1963)
53. LAKI, K. u. J.A. GLADNER: Chemistry and physiology of fibrinogen fibrin transition. *Physiol.Rev.* 44, 127 (1964)
54. LAKI, K. u. L. LORAND: On the solubility of fibrin clots. *Science* 108, 208 (1948)
55. LEWIS, J.H., A.C. HOWE u. J.H. FERGUSON: Thrombin formation. II. Effects of lysin (fibrinolysin, plasmin) on the prothrombin, Ac-globulin and tissue thromboplastin. *J.clin.Invest.* 28, 1507 (1949)
56. LINEWEAVER, H. u. D. BURK: The determination of enzyme dissoziation constants. *J.Amer.chem.Soc.* 56, 658 (1934)
57. LOEWY, A.G.: Wirkungsmechanismus des Faktor XIII, fibrin-stabilisierender Faktor, Struktur des Blutgerinnsels, Krebs und Blutgerinnung. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1968, 1
58. LOEWY, A.G., J.H. DAHLBERG, W.V. DORWART, M.J. WEBER u. J. EISELE: A transamidase mechanism for insoluble fibrininformation. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 15, 177 (1964)
59. LOEWY, A.G., J.H. DAHLBERG, K. DUNATHAN, R. KRIEL u. H.L. WOLFINGER, jr.: Fibrinase. II. Some physical properties. *J.biol.Chem.* 236, 2634 (1961)
60. LOEWY, A.G., K. DUNATHAN, R. KRIEL u. H.L. WOLFINGER, jr.: Fibrinase. I. Purification of substrate and enzyme. *J.biol.Chem.* 236, 2625 (1961)

61. LOEWY, A.G. u. J.T. EDSALL: Studies on the formation of urea-insoluble fibrin. J.biol.Chem. 211, 829 (1954)
62. LOEWY, A.G., J.A. GALLANT u. B. GARDNER: Fibrinase. III. Some enzymatic properties. J.biol.Chem. 236, 2644 (1961)
63. LORAND, L.: Fibrinopeptide. Biochem.J. 52, 200 (1952)
64. LORAND, L.: Properties and significance of the Fibrin-Stabilizing Factor (FSF). Thrombos.Diathes.haemorrh. 7, Suppl. 1, 238 (1962)
65. LORAND, L. u. A. JACOBSON: Studies on the polymerisation of fibrin. The role of the globulin:Fibrin Stabilizing Factor. J.biol.Chem. 230, 421 (1958)
66. LORAND, L. u. A. JACOBSON: Specific inhibitors and the chemistry of fibrinpolymerisation. Biochem. J. 3, 1938 (1964)
67. LORAND, L. u. K. KONISHI: Activation of the Fibrin-Stabilizing Factor of plasma by thrombin. Arch. Biochem. 105, 58 (1964)
68. LORAND, L., K. KONISHI u. A. JACOBSON: Transpeptidation mechanism in blood coagulation. Nature 194, 1148 (1962)
69. LÜSCHER, E.F.: Ein Fibrinstabilisierender Faktor aus Thrombocyten. Schweiz.med.Wschr. 87, 1220 (1957)
70. MACFARLANE, R.G.: The basis of the cascade hypothesis of blood coagulation. Thrombos.Diathes.haemorrh. 15, 591 (1966)
71. MAMMEN, E.F.: Isolierung von Plättchencofaktor I (Anti-hämophiles Globulin A, Faktor VIII) aus Rinderserum. Klin.Wschr. 39, 872 (1961)
72. MAMMEN, E.F.: The purification and properties of platelet cofactor I (factor VIII). Vox Sang. (Basel) 8, 474 (1963)
73. MAMMEN, E.F.: Investigations on the nature of Hemophilia A. Thrombos.Diathes.haemorrh. 9, 30 (1963)
74. MAMMEN, E.F.: Concentration of platelet cofactor I (factor VIII) from bovine serum. Thrombos.Diathes.haemorrh. 11, 127 (1964)
75. MAMMEN, E.F.: Plasma anticoagulants or inhibitors. Blood Clotting Enzymology. Academic Press New York/London 1967, 345

76. MAMMEN, E.F.: Irregular Blood clotting. Blood Clotting Enzymology. Academic Press New York/London 1967, 421
77. MAMMEN, E.F., U. YOSHINARI u. W.H. SEEGER: Platelet co-factors as plasma compounds of the intrinsic blood clotting mechanism. Thrombos.Diathes. haemorrh. 5, 38 (1960)
78. MARX, R., P. CLEMENTE, E. WIRLE u. W. APPEL: Zum Problem eines Antidotes in der internen Thrombotherapie mit Fibrinolytica. Blut 5, 367 (1959)
79. MARX, R., P. CLEMENTE, E. WIRLE u. W. APPEL: Über die Wirkung von Proteaseninhibitorpräparaten (Leber- und Parotisinhbitor) auf extravasale Fibrinolyse. Fibrinogenolyse und Blutgerinnungskonstanten im Menschenblut. Blut 9, 164 (1963)
80. MELANDER, B., I. GLIMECKI, G. GRANSTRAND u. G. HAUSHOFF: Biochemistry and toxicology of Aminocapron, the antifibrinolytically isomer of AMCHA (a comparative study with epsilon-amino-caproic acid). Acta pharmacol. (KBH) 22, 340 (1965)
81. MOSESSON, M.W. u. J.S. FINLAYSON: Biochemical and chromatographic studies of certain activities associated with human fibrinogen preparations. J.clin.Invest. 42, 747 (1963)
82. MÜNCH, R.: Dissertation (1968)
83. NIEWIAROWSKI, S. u. E. KOWALSKI: Un nouvel anticoagulant dérivé du fibrinogène. Rev.Hémat. 13, 320 (1958)
84. ÖZGE-ANWAR, A.H., G.E. CONELL u. J.F. MUSTARD: The activation of factor VIII by thrombin. Blood 26, 500 (1965)
85. PENICK, G.D.: Some factors that influence utilization of antihemophilic activity during clotting. Proc.Soc.exp.Biol. (NY) 96, 277 (1957)
86. PRESTON, A.E.: The factor VIII activity in fresh and stored plasma. Brit.J.Haemat. 13, 42 (1967)
87. RAPAPORT, S.I., S. SCHIFFMANN, M.J. PATCH u. B. AMES: The importance of activation of antihemophilic globulin and proaccelerin by traces of intrinsic prothrombinase activity. Blood 21, 221 (1963)

88. RATNOFF, O.D. u. C. MENCIE: A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J.Lab.clin.Med.* 37, 316 (1951)
89. ROBBINS, K.C.: A study on the conversion of fibrinogen to fibrin. *Amer.J.Physiol.* 142, 581 (1944)
90. SCHULTZE, H.E. u. G. SCHWICK: Die klinische Bedeutung der differenzierten Bestimmung von Prothrombin und Acceleratoren der Blutgerinnung (I) *Medizinische* 1354 (1953)
91. SEEGER, W.H.: A theoretical consideration of the blood clotting mechanism in Hemophilia. *Schweiz. med.Wschr.* 84, 781 (1954)
92. SEEGER, W.H.: Use and regulation of the blood clotting mechanism. *Blood Clotting Enzymology.* Academic Press New York/London 1967, 1
93. SEEGER, W.H., N. AOKI u. E. MARCINIAK: Autoprothrombin C and the generation of thrombin from prothrombin activation mixtures. *New Istanbul Contr.clin.Sci.* 5, 170 (1962)
94. SEEGER, W.H. u. E.C. LOOMIS: Prothrombin and fibrinolysin. *Science* 104, 461 (1946)
95. SEEGER, W.H. u. E. MARCINIAK: Some activation characteristics of the prethrombin subunit of Prothrombin. *Life Science* 4, 1721 (1965)
96. SEEGER, W.H., E. MARCINIAK u. D. HEENE: Enzyme basis of prothrombin activation (blood clotting) with an analysis of Hemophilia B. *Tex. Rep.Biol.Med.* 23, 675 (1965)
97. SEEGER, W.H., H. SCHROER u. E. MARCINIAK: Activation of Prothrombin. *Blood Clotting Enzymology.* Academic Press, New York/London 1967, 104
98. SEN, N.N., K.W.E. DENSON u. R. BRIGGS: A study of anti-haemophilic globulin (factor VIII) consumption. *Thrombos.Diathes.haemorrh.* 14, 12 (1965)
99. SHMERLING, D.H., E. JUNG u. F. DUCKERT: Eine neue Koagulopathie, infolge Mangels and Fibrinstabilisierender Faktor. *Helv.päd.acta* 15, 471 (1960)
100. SIGG, P.E.: A monoiodacetate (MIA) tolerance-test, a new quantitative method for the Fibrin-Stabilizing Factor (F XIII) assay. *Thrombos. Diathes.haemorrh.* 15, 238 (1966)
101. SIGG, P.E. u. F. DUCKERT: Ein neuer Test zur Bestimmung des Fibrinstabilisierenden Faktors. *Schweiz. med.Wschr.* 93, 1455 (1963)

102. TRIANTOPHYLLOPOULOS, D.C., T.E. TRIANTOPHYLLOPOULOS: Anti-hemophilic factor like activity of lysed fibrinogen. Life Science 6, 601 (1967)
103. TSEVRENIS, H.: Study of a case of congenital deficiency of factor XIII (FSF). Thrombos.Diathes.haemorrh. 14, 325 (1963)

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H.G. L a s c h für
die Themenstellung.

Herrn Dr. med. D.L. H e e n e möchte ich dafür danken,
daß er mir in seinem Labor einen Arbeitsplatz zur Ver-
fügung gestellt hat, mich in das Gebiet der Gerinnung
eingeführt und mir zugleich wichtige Anregungen zur
Methodik und zur Durchführung der angestellten Unter-
suchungen gegeben hat.

LEBENS LAUF

Am 11.5.1944 wurde ich als Sohn des Emil Spies und seiner Ehefrau Anna, geborene Röder, in Giessen geboren.

Von 1950 an besuchte ich in Lollar, Kreis Giessen, die Volksschule, danach von Ostern 1954 neun Jahre lang das Herdergymnasium in Giessen.

Nach im Februar 1963 bestandenem Abitur immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1963 an der Medizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität in Giessen.

Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung im Herbst 1965 begann ich an der gleichen Universität mein klinisches Studium. Im Winter 1968 habe ich an der hiesigen Universität die ärztliche Prüfung abgelegt.

